UNTERSUCHUNGEN IN VITRO ÜBER HUMORALE UND ZELLVERMITTELTE IMMUNREAKTIONEN BEI AKTIVER RESISTENZ GEGEN MIKROFILARIEN (LITOMOSOIDES CARINII, NEMATODA : FILARIOIDEA)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
BRUNHILDE ILLGEN
aus Zagreb

1983

1980

UNTERSUCHUNGEN IN VITRO ÜBER HUMORALE UND ZELLVERMITTELTE IMMUNREAKTIONEN BEI AKTIVER RESISTENZ GEGEN MIKROFILARIEN (LITOMOSOIDES CARINII, NEMATODA : FILARIOIDEA)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
BRUNHILDE ILLGEN
aus Zagreb

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	8.5.1980
Dekan:	Prof. Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. P. Wenk
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. F.P. Möhres

Inhalt

Seite

I. Einfluß verschiedener Seren auf die Freisetzung von Mikrofilarien sowie Versuche zur Kopulationsbereitschaft der Würmer

Zusammenfassung 1
Summary 2
1. Einleitung 3
2. Material und Technik 4
3. Ergebnisse
3.1. Wirkung verschiedener Seren 7
3.2. Proliferations- und Überlebenszeiten der weiblichen Würmer 8
3.3. Versuche zur Kopulation in vitro 8
4. Diskussion 12
5. Literatur 17
Tabellen 20

II. Nachweis einer spezifisch gegen Mikrofilarien gerichteten humoralen und zellulären Aktivität in vitro

Zusammenfassung 24
Summary 25
1. Einleitung 26
2. Material und Technik 27
3. Versuche und Ergebnisse
3.1. Agglutination von Mikrofilarien in verschiedenen Seren 32
3.2. Adhäsion von Makrophagen an in vitro freigesetzte Mikrofilarien in vitro 35

4. Diskussion
4.1. Agglutination von Mikrofilarien in verschiedenen Seren 39
4.2. Adhäsion von Makrophagen an in vitro freigesetzte Mikrofilarien in vitro 41
5. Literatur 46
Tabellen 53

III. Resistenz von Baumwollratten gegen zirkulierende Mikrofilarien von Litomosoides carinii

Zusammenfassung
Summary
1. Einleitung
2. Material und Technik
3. Versuche und Ergebnisse
3.1. Mikrofilarien in Immunserum inkubiert
3.2. Mikrofilarien in Normalserum inkubiert
3.3. Mikrofilarien aus Medium Tc 199
4. Diskussion
5. Literatur
Tabellen
Lebenslauf
Meine akademischen Lehrer

I. Einfluß verschiedener Seren auf die Freisetzung von Mikrofilarien sowie Versuche zur Kopulationsbereitschaft der Würmer

Zusammenfassung

Setzt man *in vitro* fötales Kälber-Serum oder Human-Serum zum Grundmedium Tc 199 zu, so geben adulte Würmer von *Litomosoides carinii* gleich viele Mikrofilarien ab wie bei Zusatz von Baumwollratten-Normalserum. In Medien mit *Meriones*- bzw. *Mastomys*-Serum werden dagegen nur wenige Mikrofilarien freigesetzt und bei *Mastomys*-Serum zudem noch immobilisiert. Hält man in vitro männliche und weibliche Würmer gemeinsam, so werden ebensoviele Mikrofilarien freigesetzt wie bei Einzelhaltung.

Vier Wochen alte (d.h. ca. 2 Wochen vor der Kopulation befindliche) Wurmpaare kopulieren *in vitro* in Tc 199 mit 33 % Baumwollratten-Serum nicht (keine Insemination der Weibchen). Die Weibchen überleben jedoch 18 Tage (harmonisches Mittel) und wachsen dabei durchschnittlich um 5 mm (28 %) in die Länge, die Männchen rollen das Hinterende in charakteristischer Weise ein. Werden 5 oder 6 Wochen alte Würmer für 4 bis 6 Tage paarweise *in vitro* gehalten und danach zu mehreren Paaren in Baumwollratten implantiert, so wachsen sie *in vivo* auf normale Länge heran, kopulieren und schütten Mikrofilarien ins zirkulierende Blut aus. Weibchen, die zur Kontrolle allein implantiert werden, wachsen ebenfalls heran, bleiben jedoch steril, d.h. *in vitro* findet keine Insemination statt.

I. Influence of different sera on the release of microfilariae and the readiness for copulation of the worms

Summary

When fetal calf serum or human serum is added to the culture medium Tc 199, adult females of Litomosoides carinii release the same amount of microfilariae in vitro as after addition of cotton rat normal serum. In contrast, in media with serum of Meriones unguiculatus or Mastomys natalensis only a few microfilariae are released; moreover, addition of Mastomys serum immobilizes them. When males and females are kept together, the same amount of microfilariae is released.

Worms 4 weeks of age (i.e., about 2 weeks before copulation) maintained in medium Tc 199 with 33 % cotton rat serum do not mate (no inesmination of the females). However, the females live 18 days (hermonic mean) in vitro and grow on average 5 mm in length (28 %) and the males roll up their tails in characteristic manner. Worms 5 or 6 weeks of age kept in pairs for 4 to 6 days in vitro were implanted into cotton rats. In vivo they grew to normal length, copulated and delivered microfilariae into the circulating blood. Females implanted solely into the recipient grew as well but remained sterile; this means that no insemination took place in vitro.

1. Einleitung

Um weibliche Adultwürmer von Litomosoides carinii zur Gewinnung von Mikrofilarien in vitro zu halten, eignet sich Kulturmedium Tc 199 mit einem Zusatz von 33 % Baumwollratten-Serum am besten (ILLGEN 1975). Anstelle des schwer zu beschaffenden Serums von Baumwollratten wäre ein käufliches Serum wünschenswert. Pferdeserum hemmt jedoch die Freisetzung von Mikrofilarien (WENK et al. 1978). In der vorliegenden Arbeit wurden deswegen neben Seren dreier verschiedener Nagetierarten auch kommerziell erhältliches fötales Kälber-Serum und Human-Serum als Zusatz zum Medium Tc 199 hinsichtlich ihres Einflußes auf die Mikrofilarienfreisetzung und die Überlebenszeit der Adultwürmer untersucht. Wie WENK und WEGERHOF (1976) zeigten, lassen sich durch wiederholte Injektion lebender Mikrofilarien in eine nicht infizierte Baumwollratte zwar weder eine nachfolgende Infektion durch metazyklische Larven noch die spätere Mikrofilarienfreisetzung durch die Weibchen verhindern, wohl aber kann das Auftreten zirkulierender Mikrofilarien im Blut unterdrückt werden ("WONG"-Effekt, nach WONG 1964). Die diesem Phänomen zugrunde liegenden immunologischen Veränderungen der Baumwollratte lassen sich durch Überschuß im Blut zirkulierender Antikörper erklären (WENK und ILLGEN 1979). Durch Zusatz verschiedener Immun-Seren (WONG-Immun-Serum, Patent-Serum) zum Medium Tc 199, sollte deren Wirkung auf Adultwürmer und Mikrofilarien bestimmt werden. Für Dipetalonema viteae postulierten JOHNSON et al. (1974) eine wiederholte Kopulation der Würmer zur Aufrechterhaltung der Mikrofilarienproduktion in vivo. Dies sollte auch für L. carinii in vitro untersucht werden, einmal um den Einfluß von Männchen auf die Freisetzung von Mikrofilarien festzustellen (TAYLOR 1960 a), zum andern, um die Kopulationsbereitschaft der Würmer zu beobachten.

2. Material und Technik

2.1. Gewinnung und Haltung der Würmer

Litomosoides carinii wurde aus Baumwollratten gewonnen, die im Alter von 2-4 Monaten durch Einsetzen in eine Zucht mit infektiösen Milben (Ornithonyssus bacoti) infiziert worden waren. Die Baumwollratten (Sigmodon hispidus) waren isogenetisch und stammten aus eigener Zucht. Sie wurden konventionell bei 24° ± 1° C, 55 % relativer Feuchte und 12 h Tageslicht auf Sägemehl gehalten und mit Altromin Nr. 1320 für Ratten und Mäuse gefüttert, Wasser ad libitum. Zur Parasitenhaltung, Serumgewinnung und für alle übrigen Versuche wurden ausschließlich Weibchen im Alter zwischen 5 und 12 Wochen verwendet. Je nach Versuchsziel wurden Baumwollratten zur Gewinnung adulter Würmer (aW) 10-13 Wochen post infectionem (p.i.) bzw. juveniler Würmer (jW) 4-6 Wochen p.i. mit Äther getötet und danach obduziert. Die Würmer wurden mit einer Federstahlpinzette aus der Pleurahöhle herausgehoben und in vorgewärmtes Medium Tc 199 (SERVA, Heidelberg, nach PARKER und HANKS) gebracht, welchem Streptomycin, Penicillin-G und Phenolrot als Indikator hinzugefügt wurden (ILLGEN 1975). Stets wurden in Versuch und Kontrolle Würmer aus dem gleichen Spendertier verwendet. Baumwollratten mit hoher Wurmladung (mehr als 100 Männchen und Weibchen) wurden nicht als Spender verwendet (Schädigung der adulten Würmer durch Crowding-Effekt).

Für die Versuche mit Adultwürmern in vitro wurden nur voll bewegliche, unverletzte Würmer verwendet und je 1 weiblicher Adultwurm (1♀aW) bzw. 1 weiblicher und 1 männlicher Adultwurm (1 ♀ aW + 1 ♂ aW) in ein Kulturröhrchen aus Glas (Typ Leighton) in 2 ml steriles Medium eingesetzt und unter Luft als Gasphase bei 37° C und pH 7,2 inkubiert. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 48 Stunden. Die juvenilen Würmer wurden mit Tc 199 aus der eröffneten Pleurahöhle des Spenders herausgespült

und anschließend etwa 20-30 jW pro Röhrchen mit 2 ml Medium eingesetzt und bei 37° C inkubiert. Das Kulturmedium wurde auch hier alle 48 Stunden gewechselt (WENK et al. 1978).

2.2. Kulturmedien

Als Zusätze zum Grundmedium Tc 199 (s. oben) dienten: fötales Kälber-Serum (Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, USA) in verschiedenen Konzentrationen, sowie Human-, Meriones-, Mastomys- und Baumwollratten-Serum von parasitenfreien Individuen, Baumwollrattenpatent-Serum (Serum infizierter Tiere mit Mikrofilarämie) und sog. Baumwollratten-Immunserum, von Tieren, die durch mehrfache Injektionen lebender Mikrofilarien vor der späteren Belastungsinfektion mit metazyklischen Larven immunisiert worden waren (WONG 1964; NICKELS 1974; WEGERHOF und WENK 1975; WEGERHOF 1977; KIMMIG et al. 1978). Alle Seren wurden von uns selbst gewonnen (WENK et al. 1978) und zur Aufbewahrung in Portionsfläschchen à 2 ml bei -20° C eingefroren.

2.3. Untersuchung der Würmer

Am Ende eines Versuches in vitro wurden die abgestorbenen Würmer in Medium Tc 199 gewaschen und die Männchen auf Spermien (TAYLOR 1960 b), die Weibchen auf Mikrofilarien bzw. Embryonalstadien mikroskopisch untersucht und ausgemessen. Danach wurden sie in einem speziell hergestellten Mörser aus transparentem Kunststoff mit Hilfe eines Skalpells zerstückelt, dann zerrieben und die Suspension anschließend 20 min. bei 2000 U/min. zentrifugiert. Im Sediment wurde die Zahl der bei Ende des Versuches in den Uteri verbliebenen Mikrofilarien bzw. Embryonalstadien bestimmt. In den Versuchen zur Kopulation wurde bei jedem Mediumwechsel ein Wurm entnommen und auf dieselbe Weise untersucht.

2.4. Implantation juveniler Würmer in Empfängertiere

Die Würmer wurden 4 oder 5 Tage *in vitro* in Medium Tc 199 mit 33 % BWR-Serum als Zusatz gehalten und anschließend in die Peritonealhöhle einer helminthenfreien Baumwollratte implantiert, da eine Implantation an den natürlichen Sitz der Würmer, die Pleurahöhle, aus chirurgisch-technischen Gründen nicht ohne weiteres durchführbar ist. Zum Test auf eventuell produzierte Mikrofilarien wurden den mit Äther betäubten Baumwollratten mit einer Glaskapillare Blut aus dem retroorbitalen Veneplexus entnommen (Verdünnungsverfahren, WEGERHOF 1977).

Sechzehn Wochen p.i. wurden die Baumwollratten in Äthernarkose ausgeblutet, die in die Peritonealhöhle implantierten Würmer gezählt und mikroskopisch auf Spermien bzw. auf Embryonalstadien, Mikrofilarien und Spermien untersucht. Die Pleura- und Peritonealflüssigkeit sowie das Lungenblut wurden nativ auf Mikrofilarien untersucht.

2.5. Statistik

Zur statistischen Sicherung der Ergebnisse wurden die Datenreihen von Versuch und Kontrolle im Rangtest nach WILCOXON auf ihre Signifikanz geprüft. Für die Überlebens- und Freisetzungszeit wurde das harmonische Mittel berechnet. Die Menge der freigesetzten Mikrofilarien bzw. Embryonalstadien wurde als arithmetisches Mittel des Totals (aMT) angegeben (CAVALLI-SFORZA 1969).

3. Ergebnisse

3.1. Wirkung verschiedener Seren

In je 6 Röhrchen mit je 1 ♀ aW bzw. je einem solchen Paarchen von L. carinii wurden in Medium Tc 199 mit 33 % fötalem Kälber-Serum 16×10^5 Mikrofilarien pro Weibchen (= Mf/♀ aW) bzw. 7×10^5 Mf/♀ aW freigesetzt. Bei Zusatz von 10 % fötalem Kälber-Serum setzten sowohl die einzeln, wie auch die mit je einem Männchen gehaltenen Weibchen etwa gleich viele Mikrofilarien frei (Tab. 1).

Bei Zugabe von 33 % Meriones- bzw. Mastomys-Serum wurden von den Weibchen signifikant weniger Mikrofilarien freigesetzt als in der Kontrolle in gleichem Grundmedium mit Zusatz von 33 % Baumwollrattennormal-Serum (Tab. 1). Im Versuch mit Mastomys-Serum wurden die freigesetzten Mikrofilarien bereits nach 18 Stunden immobilisiert, und nach 48 Stunden waren nur noch 11 % der Mikrofilarien beweglich.

Fügte man 33 % Baumwollrattenparasit- bzw. Baumwollratten-Immunserum zum Medium Tc 199 hinzu, so bestand hinsichtlich der Zahl freigesetzter Mikrofilarien kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle mit 33 % Baumwollrattennormal-Serum als Zusatz (Tab. 1). Jedoch agglutinierte das WONG-Serum die Mikrofilarien zu Klumpen von 10-20 Stück, was in späteren Experimenten genauer untersucht werden soll (ILLGEN, in Vorbereitung).
Gab man 33 % Human-Serum zum Medium Tc 199, so wurden von 5 weiblichen Adultwürmern $2{,}0 \pm 0{,}4 \times 10^5$ Mf/♀ aW und $0{,}1 \pm 0{,}1 \times 10^5$ Embryonalstadien Weibchen freigesetzt. Insgesamt enthielt ein Weibchen $2{,}0 \pm 1{,}0 \times 10^5$ Mikrofilarien und Embryonalstadien. Die zu diesem Versuch gesondert durchgeführte Kontrolle mit Tc 199 + 33 % Baumwollrattennormal-Serum wies keine signifikanten Unterschiede auf.

3.2. Proliferations- und Überlebenszeiten der weiblichen Würmer

In den Versuchen mit 33 % bzw. 10 % fötalem Kälber-Serum zu je 100 und einzeln gehaltenen Weibchen war die Proliferationszeit im Vergleich zur Kontrolle mit 33 % Baumwollrattennormal-Serum signifikant verkürzt. Dies traf auch für den Versuch mit 10 % fötalem Kälber-Serum und in Pärchen gehaltenen Würmern zu. In diesem Fall war auch die Überlebenszeit signifikant verkürzt (Tab. 2).

Mit 33 % Meriones-Serum war lediglich die Überlebenszeit der Weibchen im Vergleich zur Kontrolle verkürzt, während mit 33 % Mastomys-Serum sowohl die Proliferations- als auch die Überlebenszeit signifikant verkürzt war (Tab. 2). 33 % Baumwollrattenpatent-Serum verkürzt die Überlebenszeit der Weibchen, während Baumwollratten-WONG-immun-Serum sowohl die Proliferations- als auch die Überlebenszeit verkürzt (Tab. 2).

Bei 33 % Human-Serum war sowohl die Proliferations- als auch die Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrolle signifikant verkürzt.

3.3. Versuche zur Kopulation in vitro

Die dritten, infektiösen Larven von L. carinii entwickeln sich in der Baumwollratte in etwa 6 Wochen zu fertilen adulten Würmern. Die Länge des Weibchens beträgt bei hoher Wurmlast etwa 80 mm, bei geringer Wurmlast bis zu 120 mm, die eines Männchens 20-26 mm.

3.3.1. Versuch mit 4 Wochen alten Würmern

Wurden die Würmer aus dem Spendertier 4 Wochen p.i. entnommen, so waren sie 16-20 mm lang. Weibchen und Männchen konnten makroskopisch noch nicht unterschieden werden. Das Spikulum bzw. die Uterusschläuche waren zwar zu diesem Zeitpunkt bereits entwickelt, auf eine nähere makroskopische Untersuchung wurde jedoch verzichtet, um die Würmer nicht zu beschädigen.

Jeweils 15 juvenile Würmer brachte ich zusammen in ein Röhrchen mit Medium Tc 199 + 33 % Baumwollrattennormal-Serum, wobei das Medium alle 48 Stunden gewechselt wurde. Die Würmer bewegten sich etwa eine Woche lang sehr intensiv; sie rollten sich auf und verknäulten sich ineinander. Danach ließ die Beweglichkeit nach, bis auch der letzte Wurm nach 21 Tagen still lag. Das harmonische Mittel der beweglichen Phase betrug 18 Tage. Nach dieser Zeit konnte man die Männchen auch makroskopisch an ihrem aufgerollten Hinterende von den Weibchen unterscheiden. Die Weibchen waren in vitro um durchschnittlich 5 mm (= 28 %), in einem Fall sogar um 8 mm (= 44 %) gewachsen. In ihren Uteri konnten jedoch keine Embryonen oder Mikrofilarien gefunden werden.

3.3.2. Versuch mit 5 Wochen alten Würmern

Bei 5 Wochen p.i. gewonnenen juvenilen Würmern konnte ich die Männchen an ihrem aufgerollten Hinterende bereits erkennen. Die Länge der Weibchen betrug 17-23 mm, die der Männchen ca. 20 mm. Von den insgesamt 149 weiblichen Würmern überlebten in vitro 43 Weibchen 22 Tage und 75 Weibchen 23 Tage. Am Ende des Versuches enthielten die Weibchen weder Embryonen bzw. Mikrofilarien, noch Spermien, sondern nur Oozyten in ihren Uteri. Die Weibchen waren in vitro um 3-5 mm (= 20 %) gewachsen.

Um festzustellen, ob die Würmer geschädigt werden und daher nicht mehr kopulationsfähig sind, wurden 5 Wochen p.i. gewonnene Würmer 6 Tage lang in Medium Tc 199 mit BWR-Serum gehalten und danach in die Peritonealhöhle von 4 Baumwollratten implantiert. Jedes Tier erhielt jeweils 15 Weibchen und Männchen. Alle Untersuchungen des Blutes der Empfängerratten auf Mikrofilarien nach 1, 4, 7, 10, 14, 18, 25, 32, 42, 68, 85 und 91 Tagen (13 Wochen) blieben negativ. Bei der anschließend durchgeführten Obduktion der 4 Empfängertiere wurden die Würmer direkt an oder in der Nähe der Operationsnarbe gefunden, von Wirtszellen eingeschlossen und eingekapselt. Die Kapseln wurden zerschnitten und mikroskopisch untersucht. Die darin gefundenen Weibchen enthielten frühe Embryonen und einige wenige, in einem Falle sogar bewegliche Mikrofilarien.

3.3.3. Versuch mit 6 Wochen alten Würmern

In folgendem Versuch waren die Würmer bei ihrer Entnahme aus dem Spender 6 Wochen (42 Tage) alt. Die Weibchen waren zuvor noch nicht besamt und maßen durchschnittlich 34 mm. Nach einer Haltung von 5 Tagen in vitro gemeinsam mit männlichen Würmern wurden je 15 ♀ + ♂ in die Peritonealhöhle von 4 Baumwollratten implantiert. Vier Wochen danach entwickelten 2 Empfänger eine Mikrofilarämie, die bis zur Woche 16 auf 85 Mf/mm^3 Blut (aMt) anstieg. Bei der Obduktion nach 16 Wochen waren die weiblichen Würmer herangewachsen und maßen 77 $\pm$ 6 mm. Sie enthielten in ihren Uteri sowohl Embryonalstadien als auch voll bewegliche Mikrofilarien.

Wurden knapp 6 Wochen (39 Tage) alte Würmer für 4 Tage in vitro gemeinsam gehalten und danach nur je 5-6 Weibchen in die Peritonealhöhle von 5 Baumwollratten implantiert, so blieben die wöchentlichen Blutuntersuchungen auf Mikrofilarien die ganze Zeit über negativ. Bei der Obduktion nach 16 Wochen konnten in den Körperhöhlenflüssigkeiten

und auch im Lungenblut keine Mikrofilarien gefunden werden. Die meisten der implantierten Würmer waren auch hier in der Nähe der Operationsnarbe eingekapselt worden. Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Kapseln zerschnitten. Die weiblichen Würmer enthielten jedoch keine Mikrofilarien oder Embryonalstadien. Drei frei in der Peritonealhöhle befindliche Weibchen maßen 69 mm, 72 mm und 73 mm und waren voll entwickelt. Auch in ihnen konnten keine Spermien oder Embryonen sondern nur Oozyten gefunden werden. Als Kontrolle zu diesen Versuchen waren 42 Weibchen (5 bzw. 6 Wochen p.i. gewonnen) gleich nach ihrer Entnahme aus dem Spendertier mikroskopisch untersucht, danach zerschnitten und gequetscht worden. Keines enthielt Embryonen oder Spermien, d.h. die Kopulation hatte zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattgefunden.

4. Diskussion

Bisher war Baumwollrattennormal-Serum zur Haltung von adulten Würmern und zur Gewinnung von Mikrofilarien *in vitro* von *L. carinii* als am besten geeignet befunden worden (ILLGEN 1975; WENK et al. 1978). Ebensogut kann man auch 33 % bzw. 10 % fötales Kälber-Serum verwenden. Zudem wurden die Mikrofilarien in diesen Medien rascher freigesetzt. Dagegen wurden bei Zugabe von *Meriones*- wie auch *Mastomys*-Serum zum Medium Tc 199 die meisten Mikrofilarien in den Uteri der Weibchen zurückgehalten. Die wenigen freigesetzten Mikrofilarien waren bei Zusatz von *Mastomys*-Serum außerdem fast alle nach kurzer Zeit immobilisiert. Ähnliches war bei der Verwendung von Pferde-Serum beobachtet worden (ILLGEN 1975; WENK et al. 1978). Dies überraschte insofern, als *Mastomys* ein guter und *Meriones* zumindest ein brauchbarer experimenteller Wirt für *L. carinii* ist. Die für die Immobilisierung verantwortlichen Faktoren fehlen offenbar im Kälber-Serum. Allerdings leben die Würmer *in vivo* in der Pleurahöhle ihrer Wirte, d.h. sie befinden sich in Pleuraflüssigkeit und nicht in Serum. Beim natürlichen Wirt, der Baumwollratte, spielt dieser Unterschied offensichtlich keine Rolle, bei den experimentellen Wirten könnte dies aber der Fall sein. Bei Zusatz von Baumwollrattenpatent-Serum bzw. Immunserum zu Medium Tc 199 erhält man gleich viele Mikrofilarien wie beim Zusatz von normalem BWR-Serum. Lediglich die Überlebenszeit der weiblichen Adultwürmer war gegenüber Baumwollrattennormal-Serum signifikant verkürzt. Im Immunserum wurden die Mikrofilarien jedoch regelmäßig zu Klumpen von 10-20 Mikrofilarien agglutiniert, wobei sie bis zu 48 Stunden beweglich blieben. Demnach scheint die Oberfläche der neugeborenen Mikrofilarien mit einem agglutinierenden Antikörper zu reagieren, der nur im Immunserum in ausreichender Menge vorhanden ist. Durch Patent-Serum und vor allem durch Postpatent-Serum werden die Mikrofilarien nicht agglutiniert (ILLGEN 1975). Postpatent-Serum stammt

von stark infizierten Tieren, bei denen nach längerer Patenz die Mikrofilarien spontan aus dem zirkulierenden Blut verschwinden. Solche Tiere enthalten adulte Würmer, die häufig sogar noch Mikrofilarien in die Pleurahöhle freisetzen. Wegen der ausbleibenden Agglutinationsreaktion kann man sie jedoch nicht mit den von uns als Immun-Tiere bezeichneten Tieren gleichsetzen. In Patent- bzw. Postpatent-Serum könnten die humoralen Antikörper durch die zahlreichen in den Lungenkapillaren akkumulierten Mikrofilarien abgefangen worden sein (WENK 1978; WENK und ILLGEN 1979).

Eine von TAYLOR (1960 a) berichtete bessere Ausbeute von Mikrofilarien durch die Zugabe von männlichen Würmern zu den Weibchen konnte in entsprechenden Versuchen von mir nicht bestätigt werden. In zwei Versuchen (33 % fötales Kälber-Serum, 10 % fötales Kälber-Serum), in denen Männchen zu den Weibchen gesetzt worden waren, wurden sogar signifikant weniger Mikrofilarien freigesetzt als in Versuchen mit einzelnen Weibchen. In unseren Versuchen waren die Würmer stets aus dem gleichen Wirtstier gewonnen worden, und eine eventuelle Schädigung durch "Overcrowding" müßte sich in vitro in Versuch und Kontrolle gleich auswirken. Die unterschiedliche Gesamtzahl der in den Würmern enthaltenen Mikrofilarien und Embryonalstadien hängt von der ursprünglichen Anzahl der Weibchen im Spendertier ab. Je weniger Weibchen in der Pleurahöhle enthalten sind, umso mehr Mikrofilarien bzw. Embryonen enthalten sie in ihren Uteri. Je mehr Würmer gefunden werden, umso kürzer werden die Weibchen, und sie enthalten auch weniger Mikrofilarien (WENK und NEEF 1970; GIRSANG 1972). Möglicherweise hat TAYLOR (1960 a) dies nicht beachtet und verschiedene Spender verwendet. Weshalb jedoch in unseren Versuchen mit paarweise gehaltenen Würmern sogar weniger Mikrofilarien freigesetzt wurden, ist m.E. nur so zu erklären, daß die Fertilität einzelner sonst normal erscheinender Weibchen auch in demselben Wirtstier erheblich (z.B. periodisch) voneinander abweichen kann.

Bei Haltung in vitro war der initiale Ausstoß von Mikrofilarien stets am höchsten, was auch schon früher beobachtet worden war (HAWKING 1954; TAYLOR 1960 a; WEINSTEIN und SAWYER 1961; ILLGEN 1975; WENK et al. 1978). Die im Vergleich zu früheren Versuchen höhere Gesamtzahl von Mikrofilarien und Embryonen zusammen, beruht wahrscheinlich auf dem in unseren Versuchen wesentlich jüngeren Lebensalter der Würmer (Entnahme 10-13 Wochen p.i.), die offenbar von vornherein mehr Mikrofilarien bzw. Embryonalstadien in ihren Uteri enthalten als vergleichsweise ältere (WENK et al. 1978). Als Durchschnitt von 63 Weibchen, die in vitro gehalten wurden, beobachtete ich einen Initialausstoß von 318 x 10^3 Mf/♀ aW/Tag. Möglicherweise ist der initiale Ausstoß der Weibchen in vitro etwas höher, als der durchschnittliche tägliche Ausstoß in vivo, denn die Würmer bewegen sich in dem dünnflüssigen Medium auffallend heftig. Außerdem wissen wir nicht, ob die Mikrofilarien schubweise austreten, was durch das künstliche Medium ebenfalls beeinflußt werden könnte. Vorsichtshalber wollen wir deshalb weiterhin 200 x 10^3 Mf/Tag/Weibchen als kontinuierlichen Ausstoß ansehen (WENK et al. 1978), damit entsprechende Berechnungen der Mikrofilarien-Produktion in vivo nicht unrealistisch werden.

Vier Wochen alte juvenile Würmer ließen sich bei der Entnahme aus der Spenderratte unter der binokularen Lupe noch nicht nach Geschlechtern unterscheiden. Erst nach einer Überlebenszeit von 18 Tagen in vitro waren die Männchen an ihrem aufgerollten Hinterende zu erkennen. In unseren Versuchen waren die Weibchen während der Haltung in vitro von 16-20 mm Länge um durchschnittlich 5 mm gewachsen, die Männchen hatten kaum an Länge zugenommen. Bei 5 Wochen alten Würmern konnten die Geschlechter schon zu Beginn unterschieden werden. In vitro wuchsen die Weibchen von 17-23 mm Länge um etwa 3-5 mm. Nach WEBBER (1954 b) gelten Würmer, die 25 Tage und älter sind, als voll ausgebildet. Die Kopulation findet bei L. carinii in vivo normalerweise etwa

30 Tage (WEBBER 1954 a) und bei D. viteae zwischen 25 und 28 Tagen p.i. (JOHNSON et al. 1974) statt. Bei unseren Würmern, die erst 5 bzw. 6 Wochen p.i. entnommen wurden, hatte eine Kopulation in vivo noch nicht stattgefunden und erfolgte auch danach in vitro sicher nicht. Auch nach Implantation der weiblichen Würmer in Baumwollratten, wurden die Empfänger nicht patent, und 16 Wochen p.i. enthielten die allein implantierten Weibchen zwar Oozyten, jedoch weder Mikrofilarien noch Spermien. Demnach hatte weder vor noch während der Haltung in vitro eine Kopulation bzw. Insemination der Weibchen stattgefunden. Wo zur Kontrolle ursprünglich 5 Wochen alte Männchen und Weibchen zusammen implantiert worden waren, enthielten die Weibchen frühe Embryonalstadien. Demnach war hier die Kopulation in vivo, d.h. nach der Implantation, erfolgt.

In dem Versuch mit 6 Wochen alten Würmern entwickelten 2 von 4 Empfängertieren, denen Männchen und Weibchen nach der in vitro-Haltung implantiert worden waren, 4 Wochen danach eine Mikrofilarämie, die bis zur Woche 16 auf 85 Mf/mm^3 Blut anstieg. Die Ausschüttung der Mikrofilarien war durch die Haltung in vitro lediglich um etwa 2 Wochen verzögert worden. Bei der Obduktion der Empfänger waren die Weibchen auf eine durchschnittliche Länge von 77 mm herangewachsen und enthielten bewegliche Mikrofilarien. Demnach hatte auch hier die Besamung in vivo nach einer Haltung in vitro noch stattgefunden.

Solange die Weibchen in vitro nicht über längere Zeit kontinuierlich Mikrofilarien freisetzen und diese nicht neu nachgebildet werden, ist das Kulturverfahren unzureichend. Vielleicht sind physikalische Faktoren nicht optimal (Gasphase, Sauerstoffkonzentration, pH). Immerhin ist in dem von mir untersuchten Medium ein Wachstum der Würmer möglich gewesen. Vielleicht müssen die Würmer auch wiederholt kopulieren, wie dies für D. viteae nachgewiesen (JOHNSON et al. 1974), jedoch für L. carinii noch nicht

bestätigt werden konnte bzw. als nicht notwendig angesehen wurde (WEBBER 1954 b). In diesem Falle müßte eine kontinuierliche Embryonenproduktion *in vitro* leichter zu erreichen sein. Eine Kopulation *in vitro* konnte mit nachweislich kopulationsbereiten Würmern nicht erreicht werden. Auch die von TAYLOR (1960 a) berichtete größere Ausbeute an freigesetzten Mikrofilarien durch die Zugabe von Männchen zu den Weibchen ist daher wahrscheinlich nicht auf eine erneute Kopulation der Würmer zurückzuführen.

5. Literatur

Cavalli-Sforza L (1969) Biometrie. Übersetzung aus dem Italienischen Gustav Fischer Stuttgart.

Girsang P (1972) Populationsdynamische Untersuchungen an Litomosoides carinii (Nematoda, Filariidae). Vergleich verschieden großer Wurmpopulationen vor und nach Eintritt der Patenz. Diss Med, Tübingen

Hawking F (1954) The reproductive system of Litomosoides carinii, a filarial parasite of the cotton rat. III. The number of microfilariae produced. Ann Trop Med Parasitol 48: 382

Illgen B (1975) Erprobung von Medien zur Haltung von Litomosoides carinii (Filariidae: Nematoda) in vitro. Dipl Biol, Tübingen

Johnson MH, Orihel TC, Beaver PC (1974) Dipetalonema viteae in the experimentally infected jird Meriones unguiculatus. I. Insemination, development from egg to microfilaria, reinsemination and longevity of mated and unmated worms. J Parasitol 60: 302-309

Kimmig P, Wenk P, Wegerhof PH, Illgen B (1978) Versuche zur Unterdrückung der Parasitämie bei der Baumwollrattenfilariose (Litomosoides carinii) mit Mikrofilarien und BCG. Zentrbl Bakt I. Abt 257: 28

Nickels B (1974) Beeinflussung einer intravenösen Mikrofilarien-Injektion und einer nachfolgenden Belastungsinfektion durch vorangehende Splenektomie bei der Nagetierfilariose (Litomosoides carinii) (Nematoda: Filarioidea). Dipl Biol, Tübingen

Taylor AER (1960 a) Maintenance of filarial worms in vitro. Exp Parasitol 9: 113-120

Taylor AER (1960 b) The spermatogenesis and embryology of Litomosoides carinii and Dirofilaria immitis. J Helminthol 34: 3-12

Webber WAF (1954 a) The reproductive system of Litomosoides carinii, a filarial parasite of the cotton rat. I. Development of gonads and initial insemination. Ann Trop Med Parasitol 48: 367-374

Webber WAF (1954 b) The reproductive system of Litomosoides carinii, a filarial parasite of the cotton rat. II. The frequency of insemination. Ann Trop Med Parasitol 48: 375-381

Wegerhof PH, Wenk P (1975) Injections of microfilariae, progress of microfilaraemia and subsequent quantitative infection with Litomosoides carinii (Nematoda: Filarioidea) in the cotton rat. Parasitology 71: XIX-XX

Wegerhof PH (1977) Die Beeinflussung des Parasit-Wirt-Verhältnisses zwischen der Nagetierfilarie Litomosoides carinii (Nematoda: Filarioidea) und der Baumwollratte (Sigmodon hispidus) durch Injektion von Mikrofilarien. Diss Biol, Tübingen

Weinstein PP, Sawyer TH (1961) Survival of adults of Dirofilaria uniformis in vitro und their production of microfilariae. J Parasitol 47 (Suppl): 23

Wenk P (1978) Wodurch nützen Parasiten ihren Wirten? Die Rolle der Immunreaktion im Parasit-Wirt-Verhältnis. Natw Rdsch 30: 353-359

Wenk P, Illgen B (1979) Neutralization of immunity against microfilariae of the rodent filaria Litomosoides carinii. Naturwiss 66: 626

Wenk P, Illgen B, Seitz HM (1978) In vitro-Versuche mit Litomosoides carinii (Nematoda: Filarioidea). I. Haltung von adulten Weibchen und Mikrofilarien in verschiedenen Kulturmedien. Z Parasitenk 55: 63-72

Wenk P, Neef U (1970) Die Regulation der Parasitämie bei Filarien (Litomosoides carinii, Nematoda, Filariidae). Zool Anz 33: 92-55

Wenk P, Wegerhof PH (1976) Beeinflussung einer Belastungsinfektion während der Präpatenz durch s.c. Injektion von embryonalen Mikrofilarien (Litomosoides carinii) bei Baumwollratten. Z Parasitenk 50: 180

Wong MM (1964) Studies of microfilaremia in dogs. II. Levels of microfilaremia in relation to immunologic responses of the host. Am J Trop Med Hyg 13: 66-77

Zeile	Zusatz zum Medium Tc 199	Anzahl ♀aW	im Kulturmedium Mf/♀aW	im Kulturmedium E/♀aW	in den Uteri Mf/♀aW	in den Uteri E/♀aW	Summe Mf + E/♀aW
1	Kälber-Serum 33 %	6	15,7 ± 4,8	0	0,3 ± 0,5	0,7 ± 0,6	16,6 ± 5,4
2	Kälber-Serum 10 %	6	9,3 ± 9,5	0,3 ± 0,6	0,6 ± 0,7	2,1 ± 1,6	12,0 ± 9,0
3	Watte, Kälber-Serum 33 %	6	21,5** ± 16,8	5,4** ± 8,2	0,2 ± 0,3	0,4 ± 0,5	27,6** ± 15,7
4	Meriones-Serum 33 %	7	3,4* ± 0,6	0,7 ± 0,8	8,5 ± 1,2	1,1 ± 0,8	13,7 ± 1,0
5	Mastomys-Serum 33 %	6	6,6* ± 2,6	0,3 ± 0,4	4,8 ± 3,6	1,0 ± 0,4	12,8 ± 1,5
6	BWR-p-Serum 33 %	5	10,3 ± 2,4	1,3 ± 1,4	1,2 ± 1,1	1,0 ± 0,8	13,7 ± 1,1
7	BWR-i-Serum 33 %	4	16,7 ± 3,1	1,7 ± 0,5	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,07	19,8 ± 3,1
8	BWR-n-Serum 33 % (Kontrolle)	5	12,0 ± 1,7	1,2 ± 0,6	1,1 ± 1,0	0,2 ± 0,5	14,6 ± 0,9

Tab. 1: Freisetzung von Mikrofilarien (Mf) bzw. früheren Embryonalstadien (E) und deren Rückhaltung in den Uteri bei Haltung von einzeln gehaltenen weiblichen Adultwürmern (♀aW) in verschiedenen Kulturmedien. Die Zahlen geben das arithmetische Mittel x 10^5 und die einfache Streuung an. * signifikanter Unterschied $2\alpha = 0.01$ gegenüber Kontrollwert (BWR-n-Serum). ** Unterschied signifikant zur Kontrolle, jedoch nicht aussagekräftig, da im Spender bereits mehr Mf enthalten waren. BWR- (Baumwollratten), n- (normal), p- (patent), i- (Immun) Serum

Medium Tc 199 und	Anzahl ♀/o	im Kulturmedium Mf/♀aW	im Kulturmedium E/♀aW	in den Uteri Mf/♀ aW	in den Uteri E/♀aW	Summe Mf + E/♀aW
Kälber-Serum 33 %	6/6	7,2 ± 0,9*	0	1,6 ± 2,1	1,3 ± 1,3	1,0 ± 3,9
Kälber-Serum 10 %	6/6	7,0 ± 6,7	3,6 ± 5,2	0,02 ± 0,03	0,2 ± 0,2	10,8 ± 11,9
Watte, Kälber-Serum 33 %	6/6	26,8 ± 16,9*	0,9 ± 1,4	4,2 ± 7,9	0,4 ± 1,1	32,3 ± 9,8

Tab. 2: Freisetzung von Mikrofilarien (Mf) bzw. früheren Embryonalstadien (E) und deren Rückhaltung in den Uteri in verschiedenen Kulturmedien bei paarweise gehaltenen weiblichen und männlichen Würmern. Die Zahlen geben das arithmetische Mittel x 10^5 und die einfache Streuung an. * signifikante Unterschiede ($2\alpha = 0.01$) gegenüber einzeln gehaltenen Weibchen, aufgeführt in Tab. 1, Zeile 1, 2, 3 (Spendertiere identisch).

Medium Tc 199 und	Anzahl ♀aW	im Kulturmedium Mf/♀aW	im Kulturmedium E/♀aW	in den Uteri Mf/♀aW	in den Uteri E/♀aW	Summe Mf + E/♀aW
Human-Serum 33 %	5	1,6 ± 0,4	0,08 ± 0,08	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	2,1 + 0,6
BWR-n-Serum 33 % (Kontrolle)	5	1,5 ± 0,1	0,06 ± 0,1	0,2 ± 0,07	0,2 ± 0,05	1,9 ± 0,1

Tab. 3: Freisetzung von Mikrofilarien (Mf) bzw. früheren Embryonalstadien (E) und deren Rückhaltung in den Uteri von einzeln gehaltenen Weibchen in Human-Serum mit entsprechender Kontrolle mit BWR-normal-Serum. Die Zahlen geben das arithmetische Mittel x 10^5 und die einfache Streuung an. Keine signifikanten Unterschiede.

Zusatz zum Medium Tc 199		Anzahl ♀aW	Freisetzungszeit in Tagen (hM)	Überlebenszeit in Tagen (hM)
Kälber-Serum	33 %	6	4,4 (2α = 0.01)	15,8
Kälber-Serum	10 %	6	5,0 (2α = 0.01)	13,0*
Watte, Kälber-Serum	33 %	6	11,8	13,6
Meriones-Serum	33 %	6	5,2 (2α = 0.01)	10,6 (2α = 0.01)
Mastomys-Serum	33 %	6	4,7 (2α = 0.01)	4,7 (2α = 0.01)
BWR-p-Serum	33 %	5	9,3	9,3 (2α = 0.02)
BWR-i-Serum	33 %	5	7,6 (2α = 0.02)	9,5 (2α = 0.02)
BWR-n-Serum (Kontrolle)	33 %	5	10,4	14,7
Kälber-Serum ♂ + ♀	10 %	6	5,7 (2α = 0.01)	7,2+ (2α = 0.01)
Kälber-Serum ♂ + ♀, Watte	33 %	6	8,6	13,6

Tab. 4: Freisetzungs- und Überlebenszeiten der adulten Würmer in Tagen (hM). Die in Klammern angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf BWR-n-Serum (Kontrolle). * 2α = 0.01, bestehende Signifikanz zum entsprechenden Versuch ohne Männchen. BWR- (Baumwollratten), n- (normal), p- (patent), i- (Immun) Serum

II. Nachweis einer spezifisch gegen Mikrofilarien gerichteten humoralen und zellulären Aktivität in vitro.

Zusammenfassung

Lebende Mikrofilarien, welche aus dem zirkulierenden Blut oder in vitro oder aus den Uteri gewonnen wurden, agglutinieren in nativem Immunserum von Baumwollratten, dagegen nicht in inaktiviertem Immunserum, sowie nicht in Seren von normalen, von patenten oder von postpatenten Baumwollratten. Blutmikrofilarien von L. carinii aus Baumwollratten werden bis 1:64 und solche von Dipetalonema viteae aus Meriones unguiculatus bis 1:2048 agglutiniert. Desgleichen werden Blutmikrofilarien von L. carinii aus Mastomys natalensis agglutiniert. Im Dunkelfeld beobachtet man angelagerte Mikropräzipitate, und im Ringtest sind agglutinierte Mikrofilarien als weiße Flocken nachweisbar. In Doppeldiffusionstesten erscheinen Präzipitatlinien nur zwischen Immun- bzw. Patent-Serum und homogenisierten Weibchen als Antigen. Makrophagen aus der Lunge von immunisierten bzw. normalen Baumwollratten sind gegenüber verschieden mit Serum vorbehandelten Mikrofilarien wesentlich aktiver als Makrophagen aus der Milz oder der Leber. Lungenmakrophagen aus Immun-Tieren lagern sich am häufigsten an zuvor mit Immun-Serum inkubierte Mikrofilarien an. Milz- bzw. Lebermakrophagen aus immunisierten bzw. normalen Tieren zeigen gleiche Aktivität.

II. Humoral and cellular activity against microfilariae in vitro

Summary

Living microfilariae of L. carinii obtained from the circulating blood or from the uteri of female worms or released in vitro are agglutinated by native immune serum of cotton rats but not by inactivated immune serum and not by sera of normal, of patent or of postpatent cotton rats. Blood microfilariae of L. carinii of cotton rats are agglutinated up to 1:64 and such of Dipetalonema viteae from Meriones unguiculatus up to 1:2048. Blood microfilariae of L. carinii from Mastomys natalensis are agglutinated, too. Agglutinated microfilariae show microprecipitates (dark filed illumination) and can be seen as white flakes in ring test. Precipitation lines appear in double diffusion tests only between immune resp. patent serum and homogenized female adult worms as antigen. Macrophages from the lung of immune resp. normal cotton rats are more active against microfilariae, pretreated with various sera compared with macrophages from the spleen or liver. The highest number of adhered lung macrophages can be seen, when previously in immune serum incubated microfilariae are reacting with lung macrophages from immunized animals. Macrophages of the spleen resp. the liver obtained from immune or normal animals show an equal activity.

1. Einleitung

Nachdem sich Mikrofilarien von Litomosoides carinii in vitro in chemisch definierten Kulturmedien in ausreichenden Mengen gewinnen lassen, (ILLGEN, 1975; WENK et al, 1978; ILLGEN, 1982) ist es möglich, sowohl humorale als auch zelluläre Faktoren der Immunreaktion gegen Mikrofilarien ohne deren vorherigen Kontakt mit einem Wirtstier in vivo und in vitro zu untersuchen. Bereits 1929 beobachteten PANDIT et al. bei Versuchen in vitro eine Steigerung der Adhäsion von Leukozyten an Mikrofilarien von Wuchereria bancrofti, wenn Serum von Elephantiasis-Patienten ohne Mikrofilarien hinzugegeben wurde. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Aktivität von Makrophagen von normalen, d.h. nicht infizierten Tieren gegen Mikrofilarien von L. carinii in vitro untersucht werden. Außerdem sollten Makrophagen von solchen Tieren untersucht werden, die ausschließlich gegen zirkulierende Mikrofilarien resistent sind. So immunisierte Tiere werden bei einer Belastungsinfektion nicht patent, auch wenn sie fertile adulte Würmer haben, die reichlich Mikrofilarien in die Pleurahöhle freisetzen. Dieses Phänomen wurde erstmals von WONG (1964) beobachtet. Entsprechendes Immunserum bzw. Makrophagen erhält man von Tieren, denen zuvor mehrfach lebende Mikrofilarien injiziert worden waren (WEGERHOF, 1977; ILLGEN, 1982).

Bereits in früheren Versuchen war eine Agglutination der Mikrofilarien von L. carinii durch Serum von immunisierten Tieren beobachtet worden (ILLGEN, 1982). Über Agglutination von Mikrofilarien war auch schon von YOELI (1956) bei W. bancrofti und von WONG (1964) bei Dirofilaria immitis berichtet worden. Nun wollten wir feststellen, welche Aktivität und Spezifität gerade dieses Serum für die Mikrofilarien von L. carinii hat.

2. Material und Technik

Zur Agglutination von Mikrofilarien wurden etwa 200-300 Mikrofilarien in Medium Tc 199 (SERVA, Heidelberg, nach PARKER und HANKS) in einem Glasröhrchen (Typ Leighton) vorgegeben und dann mit 1 ml Immunserum (s.o.) im Brutschrank bei 36-37° C inkubiert. Die Mikrofilarien wurden aus dem zirkulierenden Blut (BlMf) infizierter (patenter) Tiere mit Hilfe von Phytohämagglutinin (WENK et al., 1978a) bzw. in vitro durch die Freisetzung von weiblichen Würmern (vtMf) bzw. aus dem Uterus durch Zerschneiden und Quetschen von ♀ Würmern (uMf) gewonnen. Nach 3, 6, 24 und 36 Stunden wurden die Röhrchen mikroskopisch mittels eines Umkehrmikroskops untersucht. Nach 24 Stunden wurden kleine Proben entnommen und in einer Zählkammer nach FUCHS-ROSENTHAL (Kammertiefe 0.02 mm) nativ ausgezählt (ILLGEN, 1982).

Für eine Verdünnungsreihe verwendete ich eine Titrierplatte des Mikrotitersystems nach EPPENDORF mit 8 Reihen von je 12 Vertiefungen. Diese wurden zunächst mit 0,2 ml KREBS-III-Lösung (Verdünnungsmedium) beschickt. Danach wurden 0,2 ml Serum titriert (1:2, 1:4, 1:16, 1:32 usw.). Zuletzt gab ich in jede Vertiefung 0,2 ml Antigen (d.h. eine bestimmte Anzahl Mikrofilarien in Verdünnungsmedium). Die Titrierplatte wurde abgedeckt und bei 36-37° C aufbewahrt. Da sich die Mikrofilarien an der tiefsten Stelle des runden Bodens sammelten, ließ sich eine Agglutination nicht direkt erkennen. Daher entnahm ich nach 2, 6 und 24 Stunden Reaktionszeit aus jeder Vertiefung eine Probe von etwa 0,3 ml, überführte sie in Petrischälchen mit ebenem Boden und untersuchte sie mikroskopisch auf Agglutination. Später wurde stattdessen eine Titrierplatte mit ebenem Boden verwendet. Die Flüssigkeitsmengen betrugen dann 0,05 ml, als Verdünnungsmedium diente Medium Tc 199.

Zur Feststellung von Mikropräzipitaten auf Mikrofilarien wurden 1 ml in vitro freigesetzte Mikrofilarien in Medium

Tc 199 (etwa 200 Mf/mm^3) mit 1 ml Immunserum überschichtet und in Leighton-tubes 2 Stunden bei 36-37° C inkubiert. Danach wurde ein Tropfen dieser Suspension auf einem mit einem Deckglas abgedeckten Objektträger mikroskopisch im Dunkelfeld auf an agglutinierten Mikrofilarien anhaftende Mikropräzipitate untersucht.

Ringtest: In zwei Zentrifugengläsern wurden je 1 ml Anti-Serum, d.h. Immunserum, mit je 1 ml Antigen, d.h. Mikrofilarien in Tc 199 (etwa 100 Mf/mm^3), überschichtet und 2 Stunden bei 36-37° C inkubiert (HUMPHREY und WHITE, 1972). Die Reaktion galt als positiv, wenn anschließend weiße Flocken agglutinierter Mikrofilarien makroskopisch an der Trennschicht zwischen Antigen und Antiserum beobachtet werden konnten. Nach längerem Stehen sanken die Mikrofilarien auf den Grund des Zentrifugenglases.

Die zweidimensionale Geldiffusion nach OUCHTERLONY führte ich auf Celluloseacetatfolien (MN-Filter, 866, SARTORIUS Membranfilter) durch (WEIR, 1967). Es wurde eine Schablone mit 6 im Kreis liegenden Löchern für die Antiseren und einem zentralen Loch für das Antigen verwendet. Als Puffer gebrauchte ich einen Phosphat-EDTA-Natriumacid-Puffer, der einen Tag zuvor frisch angesetzt wurde (pH 7,0). Nach dem Auftragen der Antiseren bzw. des Antigens mit einem Stempel von 0,5 µl Inhalt wurden die Folien in einer feuchten Kammer in Aluminiumfolie eingepackt und 2 bzw. 4 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurden die Folien 10 min. in Edisonite-Lösung (0,2 g/500 ml Aqua dest.) und 30-60 min. in Kochsalzlösung (4,5 g/500 ml Aqua dest.), die mit sekundärem Natriumphosphat auf pH 7,2-7,6 gepuffert wurde, ausgewaschen. Anschließend wurden die Folien in 2 %iger Essigsäure kurz geschwenkt und zwischen Filterpapier getrocknet.

Um Stoffwechselprodukte von Mikrofilarien zu erhalten, wurden in vitro freigesetzte Mikrofilarien 2 Tage in Tc 199

gehalten und danach abzentrifugiert. Das zurückgebliebene Medium wurde dann als Antigenlösung auf die Acetatfolien aufgetragen. Zunächst verwendete ich es nativ, später 50 bzw. 100fach konzentriert. Zur Anreicherung benutzte ich eine Konzentrierkammer (MINICON B 15-15000 mW, AMICON, Holland), deren Abtrenngrenze oberhalb des Molekulargewichts von 15000 lag.

In anderen Versuchen wurden in vitro gewonnene Mikrofilarien (vtMf), Blutmikrofilarien (BlMf) und ganze weibliche Würmer (♀ aW) in einem Homogenisator aus Plexiglas mit max. 2800 U/min. homogenisiert und als Antigen verwendet.

Die verwendeten Seren wurden von den entsprechenden Versuchstieren durch Ausbluten in Äthernarkose gewonnen (WENK et al., 1978 a). Es wurde Normalserum verwendet, ferner Patentserum von infizierten Tieren mit einer Mikrofilarämie von 200-300 Mf/mm^3 Blut und Postpatentserum von Tieren, die nach längerer Patenz spontan mikrofilarien-negativ geworden waren. Das Immunserum wurde von immunisierten Tieren (s.o.) gewonnen und sowohl frisch als auch inaktiviert (30 min. 56° C im Wasserbad) untersucht. Außerdem verwendete ich noch Meriones- bzw. Mastomys-Normalserum als Antiserum von Tieren aus eigener Zucht.

Zur Herstellung einer Suspension von Makrophagen aus Lunge, Milz und Leber von normalen bzw. immunisierten Baumwollratten tötete ich die Spender durch verlängerte Exposition im Äther-Luftgemisch. Den Tieren wurde die Milz ganz, von Leber und Lunge nur die Hälfte des Organs entnommen. Die Organe wurden mit einem Siliconstopfen durch eine Stahlgaze in ein auf Eis stehendes Becherglas passiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit 5 ml Medium Tc 199 versetzt, anschließend 15 min. bei 2000 U/min. zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals mit Tc 199 aufgeschwemmt, erneut 15 min. bei 2000 U/min. zentrifugiert und zum

Sediment zuletzt 3-4 ml Tc 199 hinzugegeben. Danach wurde eine Probe mit einer Leukozytenpipette bis zur Marke 0.5 aufgezogen, mit Trypanblau (0,025 %ige Lösung in Phys. NaCl) bis zur Marke 11 verdünnt und gleichzeitig gefärbt, 4-5 min. auf dem Vibrator geschüttelt, dann die ersten 4 Tropfen verworfen und die Zellen in einer NEUBAUER-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm) gezählt. Überstieg die Zahl toter, blau angefärbter Zellen 10 % der Gesamtzellen, so war die Suspension unbrauchbar.

Um die Aktivität der Makrophagen zu bestimmen, gab ich jeweils etwa 0,2 ml der Zellsuspension in ein Leighton-tube, überschichtete mit 0,2 ml einer definierten Mikrofilariensuspension und inkubierte bei 36-37° C. Die in vitro freigesetzten Mikrofilarien (vtMf) waren entweder in reinem Tc 199 oder in verschiedenen Seren aufgeschwemmt, d.h. 2 Stunden in den betreffenden Seren bei 37° C inkubiert und kurz in Tc 199 gewaschen worden. Nach 2, 4, 5, 24 und 48 Stunden untersuchte ich kleine Proben mikroskopisch auf an Mikrofilarien angelagerte Zellen. Nach 48 Stunden wurden die an Milz- bzw. Lebermakrophagen angelagerten bzw. freien Mikrofilarien in Proben nativ in der Zählkammer nach FUCHS-ROSENTHAL (Kammertiefe 0,02 mm) ausgezählt (ILLGEN, 1982).

Für die Untersuchungen mit Lungenmakrophagen verwendete ich Leighton-tubes mit je einem Deckgläschen von 10 x 40 mm, die in die vertiefte Flachseite der Röhrchen paßten und über Nacht mit ca. 1 ml Suspension aus Lungenmakrophagen bei 36-37° C inkubiert wurden. Insgesamt stellte ich 10 Röhrchen mit Lungenmakrophagen von normalen bzw. 10 Röhrchen von immunisierten Tieren her. Am nächsten Tag wurde die überschüssige Suspension dekantiert und das Deckgläschen kurz mit Tc 199 gewaschen. Danach wurden in je 2 Röhrchen der beiden Gruppen etwa 550 vtMf/Röhrchen hinzugegeben und zusammen mit den Makrophagen inkubiert. Diese Mikrofilarien waren zuvor entweder in reinem Tc 199 aufge-

schwemmt oder durch zweistündige Inkubation mit verschiedenen Seren vorbehandelt und danach in Tc 199 gewaschen worden. Am folgenden Tag wurden die überschüssigen Mikrofilarien abgegossen und das Deckglas kurz mit Tc 199 gewaschen. Die an die Zellen angehefteten Mikrofilarien wurden jetzt in den Röhrchen auf den Deckgläsern mit Methanol fixiert (10 min.) und anschließend 25 Minuten mit verdünnter Giemsalösung gefärbt. Danach wurden die Deckgläschen zu Dauerpräparaten verarbeitet und die an Makrophagen angehefteten Mikrofilarien mikroskopisch vollständig ausgezählt.

Die Zellen, die sich an die Mikrofilarien festhefteten, hatten eine durchschnittliche Größe von 10-20 µm. Sie waren meist rundlich bis oval und hatten bei starker Vergrößerung betrachtet, oft kleine Fortsätze ausgebildet. Das Plasma war hellviolett bis bläulich und enthielt Vakuolen. Die Zellen enthielten meist nur einen großen Zellkern, der oval, selten nierenförmig gebaut war, und eine dunkelviolette Färbung aufwies. Er lag meist an der Peripherie und war ganz selten in zwei noch schwach verbundene Anteile gespalten.

Die Zahl agglutinierter bzw. an Zellen angehefteter Mikrofilarien wird in Prozent angegeben. Die Ergebnisse aus den Adhäsionsversuchen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test statistisch auf Signifikanz geprüft (CAVALLI-SFORZA, 1969).

3. Versuche und Ergebnisse

3.1. Agglutination von Mikrofilarien in verschiedenen Seren

Blutmikrofilarien (BlMf), in vitro Mikrofilarien (vtMf) und Uterusmikrofilarien (uMf), letztere sowohl lebend als auch durch Einfrieren bei -20° C über mehrere Tage getötet, wurden in Leighton-tubes mit frischem Immunserum aus Baumwollratten bei 37° C inkubiert. Nach ca. 2-3 Stunden konnten bei allen 3 Arten von lebenden Mikrofilarien die ersten agglutinierten Mikrofilarien beobachtet werden. Bereits 6 Stunden später traten Klumpen von mehr als 100 Mikrofilarien auf, deren genaue Zahl nicht mehr bestimmt werden konnte. Die abgetöteten Mikrofilarien agglutinierten nicht. Nach 24 Stunden waren bei den BlMf 88,1 % bei den vtMf 59,6 % und bei den uMf 46,9 % der Mikrofilarien agglutiniert und noch gut beweglich. Nach 36 Stunden waren sie unbeweglich und wahrscheinlich tot, da in diesen Proben höchstens 1 ml Medium vorhanden war und dieses auch nicht gewechselt wurde. In Normalserum (Kontrolle), sowie in Patent- bzw. Postpatentserum fand keine Agglutination der Mikrofilarien statt (Tab. 1).

Inaktiviertes Immunserum (30 min. bei 56° C, im Wasserbad) wurde in einem orientierenden Versuch mit Blutmikrofilarien bzw. in vitro-Mikrofilarien während 3, 14, 18 und 24 Stunden inkubiert. In mikroskopischen Untersuchungen konnte bei beiden Arten von Mikrofilarien keine Agglutination beobachtet werden. Wie erwartet agglutinierten die Mikrofilarien auch in Kontrollen mit inaktiviertem Normalserum nicht (Tab. 1).

Spezifität: Immunserum, welches stets von Baumwollratten stammte, agglutinierte auch Blutmikrofilarien von Dipetalonema viteae aus Meriones unguiculatus und von L. carinii aus Mastomys natalensis, was in je 3 Glasröhrchen beobachtet

wurde. Die Mikrofilarien waren mit Hilfe von Phytohämagglutinin aus dem zirkulierenden Blut isoliert worden (WENK et al. 1978 a).

In den folgenden Titrationsversuchen war Immunserum von 1:2 bis 1:128 mit KREBS-III-Lösung verdünnt und etwa 200-300 Blutmikrofilarien pro Vertiefung von L. carinii aus Baumwollratten bzw. von D. viteae-Blutmikrofilarien aus Meriones hinzugefügt worden. Entsprechende Verdünnungsserien wurden mit Patent- und Postpatentserum durchgeführt. Als Kontrollserie diente Normalserum, als Antigenkontrolle Blutmikrofilarien von L. carinii bzw. D. viteae in Verdünnungsmedium allein. Außerdem wurden noch alle 4 Arten von Seren mit KREBS-III-Lösung verdünnt, um eventuell auftretende Präzipitate festzustellen.

Eine Agglutination der Blutmikrofilarien von L. carinii in Immunserum war bis zur Verdünnung 1:64 nachweisbar, während in den übrigen Verdünnungsserien sowie in den Kontrollen keine Agglutination stattfand. D. viteae-Blutmikrofilarien agglutinierten noch in einer Verdünnung von 1:128 (Tab. 2 a). Bei Wiederholungen dieser Versuche mit der gleichen Ausgangsmenge von 0,2 ml und KREBS-III-Lösung als Verdünnungsmedium konnte der Effekt von Immunserum auf Blutmikrofilarien von L. carinii bestätigt werden (1:64), während die Mikrofilarien von D. viteae sogar bis zur Verdünnung 1:2048 agglutinierten (Tab. 2 b). Eine schwache Reaktion (1:16) dieser Mikrofilarien zeigte sich auch bei Verwendung von Postpatentserum. In allen anderen Versuchsserien konnte keine Agglutination beobachtet werden. Bei einer weiteren Wiederholung mit einer anderen Titrierplatte mit 0,05 ml Ausgangsmenge und Medium Tc 199 als Verdünnungsmedium konnten die oben gefundenen Ergebnisse in gleicher Weise bestätigt werden (Tab. 2 c).

Zur Feststellung von Mikropräzipitaten wurden in 3 Leighton-tubes in vitro Mikrofilarien in 1 ml Tc 199 (200 Mf/mm^3),

mit 1 ml Immunserum überschichtet und 2 Stunden im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Danach wurden Proben auf einem Objektträger mikroskopisch im Dunkelfeld untersucht. Dabei hatten die meisten der agglutinierten Mikrofilarien einen schmalen, hellen Saum (Mikropräzipitat), während nicht agglutinierte Mikrofilarien ihn nicht aufwiesen, ebenso wie die Mikrofilarien der Kontrolle mit Normalserum.

Im Ringtest konnten in 2 Zentrifugengläsern nach zweistündiger Inkubation von je 1 ml Immunserum mit Blutmikrofilarien in 1 ml Tc 199 (100 Mf/mm^3) die agglutinierten Mikrofilarien als weiße, an der Grenzfläche zwischen Antiserum und Antigen schwebende Flocken deutlich erkannt werden, die jedoch bei längerem Stehen langsam auf den Boden des Glases sanken.

In je 5 mal wiederholten (orientierenden) zweidimensionalen Diffusionsversuchen nach OUCHTERLONY konnten zwischen den Stoffwechselprodukten von Mikrofilarien, nach einer 48-stündigen Haltung in vitro, auch nach 50- bzw. 100-facher Konzentrierung und verschiedenen Seren (Immun-, Normal-, Patent-, Postpatent-, inaktiviertes Immunserum und Mastomys- bzw. Meriones-Normalserum) keine Präzipitatlinien nachgewiesen werden. In je 2 mal wiederholten Versuchen mit homogenisierten vtMf bzw. BlMf von L. carinii fand ebenfalls keine Reaktion statt. Im Kontrollversuch mit homogenisierten weiblichen Würmern als Antigen konnten bei 2 von 3 Folien Präzipitatlinien gegenüber Immun- bzw. Patentserum beobachtet werden, die geradlinig verliefen, da die beiden Auftragsstellen weit auseinanderlagen.

3.2. Adhäsion von Makrophagen an in vitro freigesetzte Mikrofilarien in vitro

In 2 Leighton-tubes wurden jeweils 240 vtMf in Medium Tc 199, in 2 weiteren Tubes je 240 vtMf vorgegeben, die zuvor 2 Stunden in Immunserum inkubiert und durch dieses agglutiniert worden waren. Anschließend wurde in je 1 Röhrchen der beiden Gruppen 1 ml Zellsuspension der Lunge von immunisierten bzw. normalen Tieren zugegeben und zusammen mit den Mikrofilarien bei 37° C inkubiert. Nach 1/2, 2, 4, 6, 14, 18, 24 und 48 Stunden wurden die Röhrchen mikroskopisch auf an Makrophagen angelagerte Mikrofilarien untersucht. Nach 2 Stunden konnte man in Röhrchen mit Immunserum inkubierten Mikrofilarien häufig am flachen Boden des Gläschens angeheftete Makrophagen erkennen, die sich heftig bewegende Mikrofilarien festhielten. Doch auch durch Schütteln der Gläschen kamen diese nicht frei. Bei den Mikrofilarien in Tc 199 konnte ebenfalls eine Anlagerung von Makrophagen beobachtet werden, jedoch sehr viel seltener. Die Herkunft der Zellen, ob aus einem immunisierten oder einem normalen Tier, hatte keinen erkennbaren Einfluß. Nach 4, 6, 14, 18, 24 und 48 Stunden waren schließlich in allen Proben an Makrophagen festgeheftete Mikrofilarien zu beobachten.

Zur quantitativen Erfassung der Ergebnisse wurden in einem neuen Versuch in 10 Röhrchen Deckgläschen mit angehefteten Lungenmakrophagen von immunisierten Tieren und in weiteren 10 Röhrchen solche von normalen Tieren hergestellt. Danach wurden in je 2 Röhrchen der beiden Gruppen etwa 550 vtMf/ Röhrchen hinzugefügt und zusammen mit den Makrophagen inkubiert. Die Mikrofilarien waren entweder in reinem Tc 199 aufgeschwemmt oder durch zweistündige Inkubation mit Immun- bzw. Normal- bzw. Patent- bzw. Postpatentserum vorbehandelt und danach in Tc 199 gewaschen worden. Nachdem die Deckgläschen zu Dauerpräparaten verarbeitet worden waren, wurden die an Makrophagen festgehefteten Mikrofilarien mikroskopisch vollständig ausgezählt.

Meistens wurden einzelne Mikrofilarien am Hinterende durch die Makrophagen festgehalten und oft konnte man das aufgenommene Ende innerhalb der Zelle noch deutlich erkennen. Oft lagen auch einige Zellen dicht beieinander und hielten mehrere Mikrofilarien fest. Diese waren dann z.T. an 2 Stellen von verschiedenen Zellen fixiert.

In diesen Versuchen mit Lungenmakrophagen wurden signifikant mehr Mikrofilarien an Makrophagen aus immunisierten Tieren als an solche aus normalen Tieren abgelagert, wenn sie zuvor mit Immunserum bzw. Normalserum inkubiert wurden: immunisierte Tiere 47,3 % bzw. 34,9 %, normale Tiere 25,5 % bzw. 10,8 %. An Mikrofilarien, die mit Patentserum bzw. Postpatentserum vorbehandelt oder unbehandelt (Tc 199) waren, lagerten sich etwa gleich viele Makrophagen, sowohl aus immunisierten als auch aus normalen Tieren, an (Tab. 3).

In den anderen Versuchen mit Lungenmakrophagen von immunisierten Tieren fand eine vermehrte Anlagerung von Makrophagen an Mikrofilarien statt, wenn die Mikrofilarien mit Immunserum vorbehandelt wurden. In den Versuchen mit Makrophagen aus normalen Tieren fand sich bei Vorbehandlung der Mikrofilarien mit Normal- bzw. Patentserum gegenüber Immunserum eine signifikant niedrigere Adhäsion von Makrophagen an Mikrofilarien.

In weiteren Versuchen mit Makrophagen aus Milz bzw. Leber wurden in 6 Glasröhrchen je 0,2 ml Zellsuspension von der Milz einer immunisierten Baumwollratte, in weiteren 6 Röhrchen Zellsuspension einer normalen Milz vorgegeben. Je 2 Röhrchen der beiden Gruppen wurden 320 vtMf in Tc 199 (0,2 ml), je 2 weiteren Röhrchen 320 durch Immunserum vorbehandelte Mikrofilarien (0,2 ml) und schließlich je 2 Röhrchen 320 mit Patentserum vorbehandelte Mikrofilarien (0,2 ml) hinzugegeben.

Auf dieselbe Weise wurden insgesamt 12 Röhrchen mit Makro-

phagen der Leber hergestellt, 6 Röhrchen mit Zellen aus immunisierten Spendertieren und 6 Röhrchen mit Zellen aus normalen Tieren.

Wieder wurden die Röhrchen nach 1/2, 2, 4, 6, 14, 18, 24 und 48 Stunden Inkubation bei 37° C nativ mikroskopisch untersucht. Nach einer halben Stunde lagen die Mikrofilarien sowohl in den Röhrchen mit Milzmakrophagen als auch in denen mit Makrophagen der Leber einzeln und frei beweglich zwischen den Zellen. Die vorherige Inkubation der Mikrofilarien mit verschiedenen Seren und auch die Herkunft der Zellen, ob aus einem immunisierten oder einem normalen Tier, hatte zu diesem Zeitpunkt noch keinen Einfluß auf die Anlagerung von Makrophagen. Nach 2 Stunden Inkubation waren die mit Immunserum vorbehandelten Mikrofilarien agglutiniert und vereinzelt waren auch Makrophagen der Milz bzw. Leber aus immunisierten bzw. normalen Baumwollratten an diese angelagert. Ganz selten waren auch Makrophagen der Milz, bzw. nach 4 Stunden der Leber, aus immunisierten Tieren an mit Patentserum vorbehandelten Mikrofilarien angelagert. Wiederum konnten durch Schütteln der Gläschen Mikrofilarien und angelagerte Makrophagen nicht voneinander getrennt werden. Nach 6, 14, 18 und 24 Stunden war keine Veränderung aufgetreten. Nach 48 Stunden wurden mit einer Pipette Proben entnommen und die an Makrophagen angelagerten bzw. freien Mikrofilarien in einer Zählkammer nativ ausgezählt (ILLGEN, 1982). Daraus wurde die Prozentzahl angelagerter zur Gesamtzahl Mikrofilarien bestimmt (Tab. 4).

Die häufigste Anlagerung von Mikrofilarien an Makrophagen, sowohl aus der Milz als auch der Leber, wurde bei mit Immunserum vorbehandelten Mikrofilarien beobachtet (Tab. 4, erste Zeile). In Patentserum vorbehandelte Mikrofilarien bzw. Mikrofilarien in Tc 199 lagerten sich in etwas, jedoch nicht signifikant, geringerer Zahl an Makrophagen, sowohl aus der Milz als auch aus der Leber, an. Die Natur der Spendertiere, ob immunisierte oder normale Tiere, war nur

bei Milzmakrophagen und mit Patentserum vorbehandelten Mikrofilarien von Bedeutung (Tab. 4, zweite Zeile). Demnach heften sich auch Makrophagen aus Milz bzw. Leber in allen Fällen an Mikrofilarien an, ihre Aktivität wird nach vorheriger Inkubation der Mikrofilarien mit Immunserum zwar regelmäßig, jedoch nicht signifikant, gesteigert. Insgesamt wurden signifikant mehr Mikrofilarien an Makrophagen der Milz von immunisierten Spendern als an Makrophagen aus normalen Tieren angeheftet ($p \leq 0.01$). Bei den Versuchen mit Makrophagen aus der Leber unterschied sich die Zahl angelagerter Mikrofilarien zwischen immunisierten Spendern und normalen Spendern nicht.

Verglich man die Herkunft der Makrophagen aus den verschiedenen Organen, sowohl von immunisierten wie auch von normalen Tieren miteinander, so wurden an Makrophagen der Lunge zwischen 4- und 10mal mehr Mikrofilarien angelagert als an Makrophagen der Leber bzw. Milz (vergleiche Tab. 3 und 4).

4. Diskussion

4.1. Agglutination von Mikrofilarien in verschiedenen Seren

In unseren Versuchen wurden sowohl Blutmikrofilarien als auch in vitro Mikrofilarien und Uterusmikrofilarien bereits nach 2 Stunden, jedoch ausschließlich durch das Immunserum, agglutiniert. Patentserum, wie auch Postpatentserum, führt nicht zur Agglutination, ebensowenig wie Normalserum. Im Patent- wie auch im frühen Postpatentserum werden die Antikörper offenbar durch die dichte Konzentration der Mikrofilarien in den Lungenkapillaren gebunden (ISHII, 1970; WEGERHOF, 1977; WENK et al., 1978 b). Offensichtlich sind nur im Immunserum entsprechende Faktoren, d.h. freie Antikörper im Überschuß enthalten, welche zur Agglutination der Mikrofilarien führen.

Möglicherweise richten sich die agglutinierenden Antikörper, die im Blut von immunisierten Tieren gebildet werden, nur gegen Stoffwechselprodukte lebender Mikrofilarien, denn durch Einfrieren abgetötete Mikrofilarien werden nicht agglutiniert. Eine Agglutination von Mikrofilarien war schon früher beobachtet worden. WONG (1964) beschrieb lebende, ungescheidete, agglutinierte Mikrofilarien von Dirofilaria immitis, sogenannte "Medusenhäupter", in Hunde-Serum, welches von Tieren gewonnen wurde, die mehrfache Injektionen von Mikrofilarien erhalten hatten. Auch gescheidete Mikrofilarien, z.B. von Wuchereria bancrofti, agglutinieren in venösem Blut von denselben Patienten (YOELI, 1956) oder Loa loa-Mikrofilarien in entsprechendem Citrablut (McQUAY und SCHMUTZER, 1966). Übrigens werden auch Oncosphären von Hymenopepis nana durch Mäuseseren mit schützender Immunität agglutiniert (ITO, 1975).

Immunserum agglutiniert außerdem Blutmikrofilarien von L. carinii aus Mastomys natalensis bzw. solche von Dipetalonema viteae aus Meriones unguiculatus bis zu einer Verdünnung von 1:2048. L. carinii-Blutmikrofilarien aus Baumwoll-

ratten werden bis zur Verdünnung von 1:64 agglutiniert. Demnach haben alle diese Mikrofilarien auf ihrer Oberfläche ein ähnliches Antigen-Muster, wobei unter der Oberfläche stets die Eihaut ("Scheide") zu verstehen ist. Wirtsspezifische Proteinauflagerungen, soweit sie überhaupt vorhanden sind, haben keinen Einfluß, d.h. sie maskieren das Antigen auf der Oberfläche der Mikrofilarien nicht. Möglicherweise befindet sich auf der Oberfläche der Mikrofilarien von D. viteae sogar mehr Antigen, d.h. es werden mehr Stoffwechselprodukte freigesetzt, so daß Immunserum in noch stärkerer Verdünnung als auf L. carinii-Mikrofilarien wirkt. Auch in vivo scheinen Kreuzreaktionen zwischen L. carinii-Antikörpern und D. viteae-Mikrofilarien aufzutreten. In OUCHTERLONY-Testen wurden Kreuzreaktionen zwischen L. carinii Antikörpern aus Patentserum und D. immitis-Antigenen aus Mikrofilarien entdeckt (KAMIYA et al., 1978).

Durch Immunserum agglutinierte Mikrofilarien bildeten an ihrer Oberfläche Mikropräzipitate, die man mikroskopisch im Dunkelfeld als hellen Saum deutlich sehen konnte. Diese entsprachen möglicherweise angelagertem Antiserum. Makroskopisch lassen sich agglutinierte Mikrofilarien im Ringtest als Flocken an der Grenzfläche zwischen dem zähflüssigeren Antiserum und Medium Tc 199 erkennen.

In den Doppeldiffusionstesten nach OUCHTERLONY war in den Medien, die nach einer 48stündigen Haltung von Mikrofilarien in vitro deren Stoffwechselprodukte enthalten sollten, auch nach einer Konzentrierung auf das 50 bzw. 100fache, keine Antigenität festzustellen. Entweder reichten die 0,5 µl aufgetragener Stoffwechselprodukte nicht aus, oder die fraglichen Stoffe denaturieren alsbald nach ihrer Freisetzung durch die Mikrofilarien. Wurden homogenisierte in vitro-Mikrofilarien bzw. Blutmikrofilarien als Antigen verwendet, so konnte man ebenfalls keine Präzipitatlinien sehen.

Verwendete man jedoch Adultwurmhomogenisat, so beobachtete man gegenüber Patentserum und Immunserum einzelne Präzipitatlinien. Diese weisen bei Patentserum auf Antikörper, vornehmlich mit Adultwurmspezifität, hin. Diese besitzen offensichtlich keine Mikrofilarien-Spezifität, denn Patentserum agglutiniert Mikrofilarien nicht. Die Körperdecke ("Hülle") sowie der flüssige Uterus- und Pseudozoelomhöhleninhalt der homogenisierten Weibchen können als Antigen wirken, wie dies schon für D. viteae im indirekten Immunfluoreszenztest nachgewiesen wurde (DIESFELD und KIRSTEN, 1978). Auch KAMIYA et al. (1978) fanden Präzipitatlinien zwischen Adultwurmantigen von L. carinii und Patentserum im OUCHTERLONY-Test, bereits zwei Wochen post infectionem. Hingegen weisen die Präzipitatlinien zwischen Immunserum und dem Adultwurmhomogenisat auf Antikörper gegen Mikrofilarien hin, die ja in den Weibchen ebenfalls enthalten sind. Offensichtlich ruft auch bei dieser Filarie jedes Stadium im Lebenszyklus die Bildung spezifischer Antikörper hervor, wie dies für Trichinella spiralis und Nippostrongylus brasiliensis bereits gefunden wurde (MACKENZIE et al., 1978).

Durch Inaktivierung verliert das Immunserum seine Wirksamkeit, es vermag die Mikrofilarien nicht mehr zu agglutinieren, und es konnten auch keine Präzipitatlinien im OUCHTERLONY-Test nachgewiesen werden. Offenbar handelt es sich um IgM-Antikörper, welche hitzelabil sind und auch nicht mit dem Antigen präzipitieren (STÄB pers. Mitteilung).

4.2. Adhäsion von Makrophagen an in vitro freigesetzte Mikrofilarien in vitro

Die Makrophagen aus der Lunge zeigten die stärkste Aktivität, und es wurde deshalb später nur mit diesen weitergearbeitet. Wahrscheinlich handelt es sich bei ihnen um zirkulierende, bei Milz und Leber hauptsächlich um sessile

Makrophagen. Möglicherweise steht die Akkumulation der Mikrofilarien in den Kapillaren der Lunge und deren Beeinflussung bei immunisierten Tieren mit der besonderen Aktivität der Lungenmakrophagen in einem mittelbaren Zusammenhang.

Wurden die Mikrofilarien zuvor mit Immunserum bzw. Normalserum inkubiert, so wurden etwa doppelt bzw. dreimal so viele Mikrofilarien an Makrophagen der Lunge aus immunisierten Spendern bzw. aus normalen Spendern angelagert. Demnach opsonisiert Immunserum die Mikrofilarien, was in beiden Fällen die Phagozytose begünstigt. Auch in Kammern eingeschlossene und in nicht infizierte Hamster implantierte D. viteae-Mikrofilarien werden erst nach einer Behandlung mit Immunserum oder dessen 19 S-Fraktion angegriffen (WEISS und TANNER, 1979). Die überall vermehrte Anlagerung von Mikrofilarien an Makrophagen aus immunisierten Tieren ist auf ihre Stimulation durch Immunisierung zurückzuführen (Tab. 3). Bekannt ist, daß Makrophagen durch Immunisierung bzw. Inkubation mit IgE-Immunserum allgemein zur vermehrten Phagozytose stimuliert werden, was für Schistosomula von Schistosoma mansoni nachgewiesen wurde (CAPRON und DESSAINT, 1975, 1977).

Die Behandlung der Mikrofilarien mit Patentserum steigert die Adhäsion beider Arten von Makrophagen nicht signifikant. Wahrscheinlich finden sich in diesem Serum nur wenige Antikörper, da die meisten durch die Akkumulation der Mikrofilarien in den Lungenkapillaren gebunden sind (WENK u. ILLGEN, 1979). Im Postpatentserum sind freie Antikörper zu erwarten, vor allem wenn die Lungen-Akkumulation der Mikrofilarien nicht mehr besteht, daher werden mit diesem Serum vorbehandelte Mikrofilarien deutlich öfter an Makrophagen angelagert. Die erstaunlich häufige Anlagerung von Mikrofilarien aus Tc 199 ist nur so zu verstehen, daß ihre native Oberfläche von beiden Arten von Makrophagen als Fremdkörper erkannt wurde und somit bei normalen und aus

immunisierten Tieren stammenden Makrophagen dieselbe Reaktion hervorruft.

Die aus den Versuchen mit Makrophagen der Lunge gewonnene Feststellung, daß bei Kombination von stimulierten Makrophagen und mit Immunserum vorbehandelten Mikrofilarien die Adhäsion am größten ist (Tab. 3), bestätigte sich in Versuchen mit Milzmakrophagen, ist jedoch bei Lebermakrophagen nicht sicher zu erkennen, da allgemein viele Mikrofilarien angelagert worden waren. Generell wurden jedoch signifikant mehr Lungenmakrophagen als Milz- bzw. Lebermakrophagen an Mikrofilarien angelagert. Nach diesen Ergebnissen spielen Leber und Milz bei der Eliminierung der Mikrofilarien aus dem zirkulierenden Blut in vivo wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle, denn auch eine Splenektomie beeinträchtigte nicht die Eliminierung von Mikrofilarien (HAWKING, 1962), ebensowenig die Ausbildung eines "WONG-Effektes" (NICKELS, 1974). Offenbar sind die Lungenmakrophagen am aggressivsten und lagern sich zwischen 4 und 10mal öfter an Mikrofilarien an. Möglicherweise eliminieren Lungenmakrophagen auch in vivo Mikrofilarien aus dem zirkulierenden Blut. Vielleicht werden auch bei menschlichen Filariosen die Mikrofilarien in der Lunge abgebaut. BEAVER (1970) brachte beim Menschen aberrant verlaufende, symptomlose Filariosen mit der in den Tropen oft erhöhten Anzahl eosinophiler Leukozyten in der Lunge ("eosinophilic lung", DANARAJ, 1961) in Verbindung. Auch Schistosomula von S. mansoni werden bei Mäusen ebenfalls nur in der Lunge abgebaut. In nicht immunisierten Tieren dauert der Abbau etwas länger als in immunisierten Tieren (von LICHTENBERG et al., 1978).

Bereits 1929 berichtete PANDIT et al (zit. nach McQUAY und SCHMUTZER, 1966), daß an lebende Mikrofilarien von W. bancrofti in Zitratblut des Spenders die Adhäsion von "Leukozyten" entlang der Oberfläche der Mikrofilarien gefördert wird, wenn man Seren von Elephantiasispatienten

ohne Mikrofilarien, d.h. Postpatentserum, zugibt. In Versuchen mit N. brasiliensis in vitro hatte allerdings Serum von immunen bzw. nicht immunen Ratten, während einer Versuchsdauer von 10 Tagen keinen Einfluß auf die Absterberaten der Adulten bzw. Larven (GERBER et al., 1976), jedoch wurden die höchsten Raten sowohl bei Adulten wie auch bei Larven mit Zellen von sensibilisierten Tieren gefunden (HÖRCHER et al., 1977). In Gegenwart des entsprechenden Antiserums hefteten sich Peritonealexudatzellen fest an Larven aus Muskelgewebe von Trichinella spiralis an (PERRUDET-BADOUX und BINAGHI, 1978). Bei Schistosomen haben Antikörper allein keinen schädigenden Einfluß auf die Schistosomula, wenn es nicht außerdem noch zu einem Kontakt zwischen Eosinophilen und den Schistosomen kommt (GLAUERT und BUTTERWORTH, 1978). Besonders stark ist die Schädigung der Schistosomula von S. mansoni, wenn durch Inkubation mit IgE-Immunserum stimulierte Makrophagen verwendet werden (CAPRON und DESSAINT, 1977). Jedoch ist für die zellvermittelte Zerstörung von D. viteae-Mikrofilarien in Hamstern die Anwesenheit von IgM erforderlich (WEISS und TANNER, 1979), was auch für die Antikörperabhängige zelluläre Immunantwort von Hamstern gegen D. viteae angenommen wird (NEILSON et al., 1981).

Offenbar muß es auch beim Abbau der Mikrofilarien von L. carinii zu einem Zusammenwirken von Antikörpern und Makrophagen kommen, wie dies allgemein von SUBRAMANYAM et al. (1978) angenommen wurde. Wie aus den vorliegenden Ergebnissen ersichtlich ist, wird in vitro eine Adhäsion von normalen Makrophagen an Mikrofilarien, die mit Immunserum inkubiert wurden, gesteigert. Die Mikrofilarien erhalten demnach eine mit Antikörpern beladene Oberfläche, die den Makrophagen die Phagozytose erleichtert (Opsonierung). Am größten ist die Anlagerung jedoch bei Verwendung stimulierter Makrophagen und mit Immunserum inkubierten Mikrofilarien. Demnach ist sowohl der immunisierte Spender der Makrophagen wie auch die Vorbehandlung der Mikrofilarien mit Immunserum wichtig.

In vivo bedeutet dies, daß Mikrofilarien, die eine mit Antikörpern beladene Oberfläche erhalten, von allen Empfängerarten schnell eliminiert werden können, besonders wenn die Empfänger vorher immunisiert wurden (ILLGEN, in Vorbereitung). Außerdem wäre in vivo noch eine unspezifische Stimulierung der Makrophagen möglich, die zu einer Vermehrung ihrer Anzahl führen würde.

5. Literatur

Beaver, P.C.: Filariasis without microfilaremia. Am.J.Trop.Med. Hyg. 19, 181-189 (1970)

Capron, A.; Dessaint, J.P.: A role for IgE in protective immunity. IRCS Med. Science: Libr. Comp. 3, 477-481 (1975)

Capron, A.; Dessaint, J.P.: Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat: a new mechanism of macrophage activation. Europ.J.Immunol. 7, 315-322 (1977)

Cavalli-Sforza, L.: Biometrie. Übersetzung aus dem Italienischen. 2. Aufl., Fischer, Stuttgart (1969)

Danaraj, T.J.: Eosinophilic lung: A study of 150 cases seen in Singapore. Singapore Painieau Studios (1951)

Diesfeld, H.J.; Kirsten, Ch.: Antigene Aktivität von Eiern, Eihüllen, Stoffwechselprodukten und geschlüpften Larven aus dem Uterus von Dipetalonema viteae. Z.Tropenmed.Parasitol. 29, 27-32 (1978)

Gerber, H.Ch.; Hörcher, F.; Zander, B.: Immunmechanismus der Ratte gegen Nippostrongylus brasiliensis in vitro. I. Einfluß von humoralen und sekretorischen Antikörpern sowie Mastzellen. Z.Parasitenkol. 50, 57-66 (1976)

Glauert, A.M.; Butterworth, A.E.: Morphological evidence for the ability of eosinophiles to damage antibody-coated schistosomula. Trans.Roy. Soc.Trop.Med.Hyg. 71, 392-395 (1977), zit. nach Helm.Abstr. 47, 2055 (1978)

Hawking, F.: The role of the spleen in controlling the number of microfilariae (Dirofilaria immitis, D. repens, Litomosoides carinii and Dipetalonema witei) in the blood. Ann.Trop. Med.Parasitol. 56, 168-172 (1962)

Hörcher, F.; Zander, B.; Gerber, H.-Ch.: Immunmechanismus der Ratte gegen Nippostrongylus brasiliensis in vitro. II. Einfluß von Peritonealexudatzellen und Lymphozyten. Z. Parasitenkol. 56, 281-288 (1977)

Humphrey, J.H.; White, R.G.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 2. Aufl., Thieme, Stuttgart (1972)

Illgen, B.: Erprobung von Medien zur Haltung von Litomosoides carinii (Filariidae: Nematoda) in vitro. Dipl.Arb. (Biol.) Tübingen (1975)

Illgen, B.: In vitro-Versuche mit Litomosoides carinii (Nematoda: Filarioidea). II. Wirkung von verschiedenen Seren auf die Freisetzung von Mikrofilarien durch adulte Würmer in vitro. Z. Parasitenkd. 67, 227-236 (1982)

Illgen, B.: Resistenz von Baumwollratten gegen zirkulierende Mikrofilarien von Litomosoides carinii. (in Vorbereitung)

Ischiii, A.: Antigenicity of exretory and secretory products of the cotton rat filaria, Litomosoides carinii. Jap.J.Exp.Med. 40, 39-45 (1970)

Ito., A.: In vitro oncosphera agglutination given by immune sera from mice infected, and rabbits injected, with eggs of Hymenolepis nana. Parasit. 71, 465-473 (1975), zit. nach Helm.Abstr., 45, 2488 (1978)

Kamiya, M.; Tanaoka, M.; Ehita, Y.; Tanaka, H.: Geldiffusion test in cotton rats, Sigmodon hispidus, infected with Litomosoides carinii. Jap.J. Parasit. 26, 67-74 (1977), zit. nach Helm.Abstr. 47, 1649 (1978)

Lichtenberg von, F.; Sher, A.; McIntire, S.: A lung model of schistosome immunity in mice. AmJ.Path. 87, 105-120 (1977), zit. nach Helm.Abstr. 47, 2065 (1978)

Mackenzie, C.D.; Preston, P.H.; Ogilvie, B.H.: Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. Nature 276, 826-828 (1978)

Neilson JTM, Crandall CA, Crandall RB (1981) Serum immunoglobulin and antibody levels and the passive transfer of resistance in hamsters infected with Dipetalonema viteae. Acta Tropica 38: 309-318.

Test Serum	Herkunft der Mikrofilarien			
	BlMf	vtMf	uMf	uMf
i-S	+	+	+	-
i-S*	-	-	-	-
n-S	-	-	-	-
n-S*	-	-	-	-
p-S	-	-	-	-
pp-S	-	-	-	-

Tab. 1 : Agglutination von lebenden Mikrofilarien, gewonnen aus Blut (MlMf), in vitro (vtMf) und aus den Uteri (uMf). Die Testseren wurden nativ bzw. einmal inaktiviert (*) verwendet und stammten von immunisierten (i-S) bzw. von normalen (n-S), patenten (p-S) bzw. postpatenten (pp-S) Tieren. Mikrofilarien abgetötet durch Einfrieren.

	BlMf D.v.-Meriones			BlMf L.c.-Baumwollratte		
	a	b	c	a	b	c
i-S	1:128	1:2048	1:2048	1:64	1:64	1:64
n-S	-	-	-	-	-	-
p-S	-	-	-	-	-	-
pp-S	-	1:16	1:16	-	-	-
Tc 199 bzw. KREBS III	-	-	-	-	-	-

Tab. 2 : Agglutination von Blutmikrofilarien (BlMf) von D. viteae (d.v.) und L. carinii (L.C.) in titrierten Baumwollrattenseren von immunisierten (i-S), bzw. normalen (n-S) bzw. patenten (p-S) bzw. postpatenten (pp-S) Tieren in verschiedenen Verdünnungsmedien (KREBS III, Tc 199). a, b, c = drei parallele Versuche.

	immun-BWR n/T	%	n-BWR n/T	%	Signifikanz zwischen immun- und n-BWR
i-S	332/700	47,3	89/255	34,9	< 0.01
n-S	109/427	25,5*	52/484	10,8*	< 0.01
p-S	49/252	19,4*	24/159	15,1*	
pp-S	27/ 94	28,7*	28/102	27,5	
Tc 199	99/352	28,1*	105/360	29,2	

Tab. 3 : Anlagerung von Makrophagen aus der Lunge von immunisierten (immun)- bzw. normalen Baumwollratten (BWR) an in vitro freigesetzte Mikrofilarien, die zuvor mit Immunserum (i-S), Normalserum (n-S), bzw. Patent- (p-S) bzw. Postpatent (pp-S) Serum oder in reinem Medium (Tc 199) vorbehandelt wurden. Die Zahlen geben die Zahl angelagerter gegenüber der Gesamtzahl (n/T) bzw. den %-Satz angelagerter Mikrofilarien an (Dauerpräparate).
* Signifikanz gegenüber Immunserum in derselben Spalte 2 $\alpha = 0.01$.

	Milz				Leber			
	immun-BWR		n-BWR		immun-BWR		m-BWR	
H-i-S	13/165	7,9	8/171	4,7	10/68	5,8	7/123	5,7
p-S	7/137	5,1*	2/149	1,3	4/97	4,1	5/137	3,7
Tc 199	4/107	3,7	4/ 98	4,1	5/109	4,6	6/142	4,3

Tab. 4 : Anlagerung von Makrophagen aus Milz bzw. Leber von immunisierten (immun)- bzw. normalen Baumwollratten (BWR) an in vitro freigesetzte Mikrofilarien, die zuvor mit Immun (i-S) bzw. Patent- (p-S) Serum oder in reinem Medium (Tc 199) vorbehandelt wurden. Die Zahlen geben die Zahl angelagerter Mikrofilarien an (nativ ausgezählt mit Zählkammer).

* Signifikanz gegenüber Zahlen aus normalen Tieren (nBWR) $2\alpha = 0.05$.

III. Resistenz von Baumwollratten gegen zirkulierende Mikrofilarien von Litomosoides carinii

Zusammenfassung

In vitro freigesetzte Mikrofilarien von Litomosoides carinii wurden mit homologem Immunserum inkubiert. Nach intravenöser Injektion dieser Mikrofilarien in immunisierte und normale, d.h. nicht vorbehandelte und nicht infizierte, Baumwollratten, traten im Blut normaler Tiere geringe Mikrofilarienkonzentrationen auf (3,1 Mf/mm^3 Blut), während in immunisierten Tieren eine Parasitämie ausblieb. Wurden die Mikrofilarien vor der Injektion mit Normalserum inkubiert, so zirkulierten in normalen Tieren 13,0 Mf/mm^3 Blut, in immunisierten Tieren 5,2 Mf/mm^3Blut. Nach der Injektion von Mikrofilarien, die in Medium Tc 199 freigesetzt wurden, zirkulierten im Blut normaler Tiere nur wenig mehr Mikrofilarien als in immunisierten Tieren (12,8 bzw. 9,4 Mf/mm^3Blut). Nach etwa einer Woche wurden die Tiere mit je 60 metazyklischen Larven infiziert. Während der Patenz betrug die maximale Parasitämie bei normalen Tieren, denen zuvor Mikrofilarinen in Tc 199 injiziert worden waren, durchschnittlich 5,2 Mf/mm^3Blut. Waren die Mikrofilarien jedoch in Normalserum oder Immunserum inkubiert worden, so wurden durchschnittlich 1,6 bzw. 0,5 Mf/mm^3Blut beobachtet. Bei 14 von 15 immunisierten Tieren blieb ungeachtet der Vorbehandlung mit den verschieden inkubierten Mikrofilarien eine Parasitämie erwartungsgemäß ganz aus.

III. Resistance of Cotton rats Against Circulating Microfilariae of Litomosoides carinii

Summary

In vitro microfilariae of Litomosoides carinii are incubated in homogenous immune serum. After their injection intravenously into immunized and normal, that means untreated and not infected cotton rats, normal animals show a low concentration of microfilariae in their blood (3.1 Mf/mm^3 blood), and parasitemia is absent in immunized animals. If microfilariae are incubated with serum of untreated animals before injection, they circulate in normal cotton rats in higher concentration than in immunized animals (13.0 rep. 5.2 Mf/mm^3blood). When untreated microfilariae, that means released in medium Tc 199, are injected, in the blood of normal animals circulate only a few and statistically not significant more microfilariae than in immunized animals (12.8 resp. 9.4 Mf/mm^3blood). About one week later, the animals were challenged with 60 metacyclic larvae per animal. During the challenge infection we saw following concentrations of microfilariae in the blood of normal cotton rats: 0.5 Mf/mm^3blood in animals, which had received microfilariae in homogenous immune serum, 1.6 Mf/mm^3blood in animals, which had received microfilariae in homogenous normal serum, and 5.2 Mf/mm^3blood in animals, which had received microfilariae in medium Tc 199. Only one of 15 immunized animals showed a small microfilaremia during the challenge infection.

1. Einleitung

Injiziert man lebende Mikrofilarien von Litomosoides carinii in normale oder in der Präpatenz befindliche Baumwollratten (Sigmodon hispidus), so wird die Mikrofilarämie einer nachfolgenden Infektion weitgehend unterdrückt. Die Entwicklung der metazyklischen Larven zu adulten Würmern und deren Fertilität wird jedoch nicht wesentlich beeinflußt (Wegerhof 1977, Kimmig et al. 1978, Kimmig und Wenk 1982, Wenk und Wegerhof 1982). Ein ähnlicher Effekt wurde erstmals mit Dirofilaria immitis beim Hund (Wong 1964) und später mit L. carinii bei Mastomys natalensis (Autenrieth 1971, Eisemann 1972) beobachtet.

Nachdem von adulten Würmern in geeigneten Medien auch Mikrofilarien in vitro feigesetzt werden (Illgen 1975, Wenk et al. 1978, Illgen 1982), lag es nahe, diese vor der Injektion mit verschiedenen homologen Seren zu inkubieren. Möglicherweise würden mit Immunserum inkubierte Mikrofilarien rascher aus der Zirkulation eliminiert. Außerdem könnte durch eine solche Vorbehandlung ihre Immunogenität, entweder durch Veränderung ihrer Oberfläche oder ihrer Vitalität, beeinflußt werden.

2. Material und Technik

Zur Gewinnung in vitro freigesetzter Mikrofilarien (vtMf) dienten Adultwürmer von L. carinii, die aus der Pleurahöhle natürlich infizierter Baumwollratten (BWR) entnommen wurden. Pro Glasröhrchen (Typ Leighton) hielt man etwa 20 weibliche Würmer für 1 Tag in 3 ml Medium Tc 199 (Serva, Heidelberg, nach Parker und Hanks) bei 36-37° C mit Luft als Gasphase und pH 7,2 im Brutschrank. Danach wurden die Weibchen entfernt und das Medium mit den darin befindlichen Mikrofilarien 15 Minuten bei 2000 U/min. zentrifugiert. Etwa 6 x 109 der auf diese Weise erhaltenen Mikrofilarien inkubierten wir jeweils 2 Stunden mit 2 ml Serum unter denselben Bedingungen und injizierten anschließend jedem Versuchstier 6 x 10^6 vtMf/kg Körpergewicht mit etwa 0,01 - 0,2 ml des entsprechenden Serums bzw. Mediums Tc 199 (maximal 2 ml/kg Körpergewicht) in den retroorbitalen Venenplexus.

Als Versuchstiere verwendeten wir 6-9 Wochen alte normale bzw. immunisierte Baumwollraten (Sigmodon hispidus). Diese waren isogenetisch und stammten aus eigener Zucht. Sie wurden konventionell bei 24^{+} 1° C, 55 % relativer Feuchte und zwölf Stunden Tageslicht auf Sägemehl gehalten und mit Altromin Nr. 1320 (Lage/Lippe) für Ratten und Mäuse gefüttert, Wasser ad libitum.

Die Immunisierung der Baumwollratten erfolgte durch eine erste subcutane Injektion von L. carinii Embryonensuspension (6x10^6E/kg Körpergewicht) und einer im Abstand von etwa 14 Tagen nachfolgenden zweiten intravenösen Injektion von 6x10^6 Blutmikrofilarien/kg Körpergewicht (Wegerhof 1975, Wegerhof und Wenk 1979). Die Immunseren wurden von entsprechend immunisierten Tieren gewonnen, die dazu ausgeblutet wurden (Wenk et al. 1978). Die Seren wurden stets frisch verwendet und nicht weiter gereinigt.

Nach Injektion der in vitro erhaltenen Mikrofilarien bestimmten wir ihre Konzentration im Blut nach 1, 3, 7 und 10 Tagen (Wegerhof 1975).

Etwa eine Woche später wurden die Versuchstiere durch Injektion von je 60 metazyklischen Larven subcutan (s.c.) in die linke Hinterpfote infiziert. Die Parasitämie wurde nach 8, 10, 13 und 16 Wochen bestimmt.

Sechzehn Wochen post infectionem (p.i.) töteten wir die Tiere mit Äther und obduzierten sie anschließend. Die in der Pleurahöhle befindlichen Adultwürmer wurden in eine Petrischale mit KREBS-III-Lösung gegeben und kurz auf Eis gekühlt, um die dadurch unbeweglich gewordenen Würmer nach Geschlechtern trennen, auszählen und ausmessen zu können. Zum Vergleich der Parasitämie verschiedener Tiergruppen bildeten wir das arithmetische Mittel aus der jeweils maximalen individuellen während der gesamten Beobachtungszeit aufgetretenen Mikrofilarämie (mx i Mfie). Außerdem wird der Anzahl mikrofilarien-positiver Tiere im Verhältnis zum Total aller untersuchten Tiere (n^+/n^T) angegeben. Die in der Pleuraflüssigkeit bzw. Lungenblut gefundenen Mikrofilarienkonzentrationen werden wegen ihrer extrem großen Streuung als geometrisches Mittel aller Versuchstiere einer Gruppe angegeben. Die mittlere Dauer der Parasitämie, die nach Injektion von Mikrofilarien auftrat, wird als harmonisches Mittel (hM) ausgedrückt (Cavalli-Sforza 1969). Die Rückfindungsrate der Adultwürmer wird in Prozent der Anzahl injizierter Larven angegeben. Alle diese Techniken wurden von Wegerhof (1977) ausführlich beschrieben.

Zur statistischen Sicherung der Ergebnisse wurde der Rangtest nach Wilcoxon (Sachs 1971) angewandt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit 2α bezieht sich auf zweiseitige Fragestellung.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1. Mikrofilarien in Immunserum inkubiert

In vitro freigesetzte Mikrofilarien wurden 2 Stunden mit Immunserum inkubiert und waren durch dieses agglutiniert worden. Man injizierte sie intravenös ohne vorheriges Waschen jedoch mit einer möglichst geringen Menge Serum (maximal 2 ml/kg Körpergewicht) in 8 normale, sowie in 5 zuvor immunisierte Baumwollratten. Bei den normalen Tieren konnten nach 1, 3, 7 und 10 Tagen regelmäßig Mikrofilarien im zirkulierenden Blut gefunden werden, während die immunisierten Tiere negativ blieben (Tab. 1). Nach etwa einer weiteren Woche wurden beide Versuchsgruppen mit je 60 metazyklischen Larven s.c. infiziert. Nach Ablauf der Präpatenz konnten bei einem der 8 normalen Tiere in der Woche 13 einige Mikrofilarien im Blut gefunden werden. Von den 5 immunisierten Tieren zeigte ebenfalls nur 1 Tier eine geringe Mikrofilarämie (Tab. 2). Die Rückfindungsrate der adulten Würmer war mit 13,3 bzw. 15,0 % etwa gleich (Tab. 3). Die Länge der Weibchen betrug in beiden Gruppen durchschnittlich 84 mm. Die Embryogenese blieb ebenfalls unbeeinflußt, die adulten Weibchen enthielten sowohl frühe Embryonalstadien als auch bewegliche Mikrofilarien. Allerdings fanden sich in der Pleuraflüssigkeit wie auch im Lungenblut der normalen Tiere signifikant weniger Mikrofilarien als bei den immunisierten Baumwollratten (Tab. 3).

3.2. Mikrofilarien in Normalserum inkubiert

Fünf normale und fünf immunisierte Baumwollratten erhielten in vitro freigesetzte Mikrofilarien mit einer geringen Menge Normalserum, in dem sie 2 Stunden inkubiert worden waren, i.v. injiziert. Die folgende Mikrofilarämie verlief bei den normalen Tieren nicht signifikant höher als bei

den immunisierten Tieren (Tab. 1). Etwa 1 Woche nach Ablauf der Mikrofilarämie wurden die Tiere beider Versuchsgruppen mit je 60 metazyklischen Larven infiziert. Vier der 5 normalen Baumwollratten entwickelten nach Ablauf der Präpatenz eine Parasitämie, während alle 5 immunisierten Tiere negativ blieben (Tab. 2). Bei der Obduktion betrug die Rückfindungsrate der Würmer 22,0 bzw. 19,3 %. Die Pleuraflüssigkeit der Tiere beider Versuchsgruppen enthielt etwa gleich viele Mikrofilarien, dagegen waren im Lungenblut der normalen Tiere signifikant mehr Mikrofilarien als in dem der immunisierten Tiere enthalten (Tab. 3). Die Länge der Weibchen aus den normalen Tieren war mit 82,6 mm signifikant geringer als die der Weibchen aus den immunisierten Tieren mit 91,2 mm Länge

3.3. Mikrofilarien aus Medium Tc 199

Fünf normale bzw. 5 immunisierte Baumwollratten erhielten Mikrofilarien i.v., die unmittelbar aus Medium Tc 199 gewonnen worden waren. In beiden Versuchsgruppen entwickelte sich nach der Injektion bei allen Tieren eine Mikrofilarämie, die bei den normalen Tieren nicht signifikant höher verlief als bei den immunisierten Tieren (Tab. 1). Nach der Infektion mit 60 metazyklischen Larven entwickelten alle 5 normalen Tiere eine schwache Parasitämie, während alle 5 immunisierten Baumwollratten negativ blieben (Tab. 2). Bei der Obduktion der Versuchstiere war die Rückfindungsrate der Würmer wiederum nicht signifikant verschieden. Die mittlere Länge der Weibchen betrug in beiden Versuchsgruppen 83 mm. Die Weibchen enthielten in allen Fällen frühe Embryonalstadien und bewegliche Mikrofilarien. Die Zahl der Mikrofilarien in der Pleuraflüssigkeit war in beiden Gruppen gleich. Im Lungenblut der immunisierten Tiere wurden nicht signifikant weniger Mikrofilarien gefunden als in dem der normalen Tiere (Tab. 3).

4. Diskussion

Eine intravenöse Injektion von *in vitro* freigesetzten Mikrofilarien von *L. carinii*, die zuvor 2 Stunden mit Immunserum inkubiert und dadurch agglutiniert worden waren, führte bei normalen Baumwollratten zu einer niedrigen Mikrofilarämie. Fünf zuvor immunisierte Tiere wiesen dagegen keine Mikrofilarämie auf (Tab. 1). Möglicherweise entfernen die immunisierten Tiere Mikrofilarien ohne Latenz aus dem zirkulierenden Blut, wenn diese zuvor durch Immunserum opsonisiert, d.h. mit Antikörpern besetzt werden. Dies geschieht wahrscheinlich mit Hilfe sog. armierter Makrophagen (Evans und Alexander 1971). Die gleichzeitige Übertragung einer geringen Menge Immunserum zusammen mit den injizierten Mikrofilarien dürfte kaum eine Rolle gespielt haben.

Wurden die Mikrofilarien vor der Injektion mit Normalserum bzw. nicht inkubiert, so entstand sowohl bei normalen wie auch in immunisierten Empfängern fast stets eine Mikrofilarämie. Diese verlief wesentlich höher als im vorausgegangenen Versuch mit Immunserum-inkubierten Mikrofilarien (Tab. 1). Normalserum verändert demnach die Oberfläche der Mikrofilarien nicht: nach Inkubation in Normalserum ergab sich die gleiche Mikrofilarämie wie bei nicht inkubierten Mikrofilarien, wenn man jeweils normale bzw. immunisierte Empfänger vergleicht.

Der fragliche Faktor im Immunserum ist hitzelabil, die agglutinierende Aktivität des Serums verschwindet nach Inaktivieren bei 56° C, 20 min. (Illgen in Vorbereitung). Offenbar handelt es sich um IgM (Stäb pers. Mitteilung). Für die zellvermittelte Zerstörung von *D. viteae*-Mikrofilarien in Hamstern wird ebenfalls die Anwesenheit von IgM notwendig erachtet (Weiss und Tanner 1979). IgM scheint auch bei der Antikörper-abhängigen zellulären Immunantwort von Hamstern gegen *D. viteae* eine Rolle zu

spielen (Neilson et al. 1981). Bei der Abtötung von L. carinii-Mikrofilarien durch Milz- bzw. Peritonealzellen soll jedoch IgG beteiligt sein (Mehta et al. 1980). Erstaunlich ist allerdings, daß nach einer dritten Injektion von Mikrofilarien in zuvor durch zwei Injektionen immunisierte Tiere überhaupt und so regelmäßig eine Parasitämie beobachtet werden kann, ausgenommen die Mikrofilarien wurden zuvor in Immunserum inkubiert. Demnach ist für die sofortige Elimination i.v. injizierter Mikrofilarien IgM auf ihrer Oberfläche notwendig. Es scheint auch bei immunisierten Tieren zunächst nicht oder wenigstens nicht in ausreichender Menge im zirkulierenden Blut vorhanden zu sein. Offenbar reichen die geringen bei der dritten Injektion verwendeten Mengen Mikrofilarien für eine Boosterung nicht aus. Infolgedessen wird auch bei bereits durch zwei Injektionen immunisierten Tieren eine geringe, allerdings gegenüber normalen Tieren nicht signifikante Reaktion beobachtet (Tab. 2, Zeile 2 und 3).

Bei einer Belastungsinfektion wird von den adulten Würmern bei Eintritt der Patenz eine im Vergleich zu einer Injektion vielfach größere Anzahl Mikrofilarien freigesetzt. Die durch insgesamt drei Injektionen immunisierten Baumwollratten erwiesen sich jedoch fast ausnahmslos, nämlich in 14 von 15 Fällen, als vollständig gegen Mikrofilarien resistent. Bei normalen Tieren reichen die mit Normalserum bzw. die nicht inkubierten Mikrofilarien als einzige Injektion zur vollständigen Immunisierung gegenüber einer späteren Belastungsinfektion nicht aus (Tab. 2, Zeile 2 und 3) : 9 von 10 Tieren zeigten in der Patenz eine allerdings recht geringe Parasitämie, obwohl ihre Wurmlast 13 oder 15 weibliche Würmer betrug. Dies wurde auch nach einmaliger Injektion von Blutmikrofilarien von L. carinii beobachtet (Nickels 1974). Obwohl die adulten Weibchen in diesen Fällen große Mengen von Mikrofilarien in die Pleurahöhle freisetzten (Tab. 3, Zeile 2 und 3), blieb die sonst zu beobachtende Akkumulation von Mikrofilarien

im Kapillarblut der Lunge weitgehend aus. Diese ist für eine meßbare Parasitämie zumindest bei Baumwollratten notwendig (Wenk und Wegerhof 1982). Normalerweise wären ohne Vorbehandlung bei gleicher Wurmlast 16 Wochen p.i. im zirkulierenden Blut etwa 100 Mf/mm^3 Blut zu erwarten gewesen (Kimmig und Wenk 1982).

Waren die zur Vorbehandlung verwendeten Mikrofilarien in Immunserum inkubiert worden, so war während der Belastungsinfektion nur noch bei einem von 8 normalen Tieren kurzfristig eine schwache Mikrofilarämie zu beobachten gewesen (Tab. 2 Zeile 1). Die bei der Vorbehandlung gleichzeitig übertragene geringe Menge von Immunserum kann hier kaum zusätzlich immunisierend gewirkt haben : Die Belastungsinfektion wurde erst nach Ablauf der Injektions-Parasitämie, d.h. ca. 1 Woche später durchgeführt und die Patenz der Infektion setzte erst nach weiteren 8 Wochen ein. Nach diesen Zeitspannen ist eine zusätzliche passive Immunisierung der Versuchstiere durch ungereinigtes Immunserum kaum mehr anzunehmen (Humphrey und White 1972). Tatsächlich läßt sich mit ungereinigtem Immunserum die Parasitämie natürlich infizierter Baumwollratten nur zwei Tage lang teilweise reduzieren (Stäb pers. Mitteilung). Erst wenn größere Mengen Immunserum, etwa 3 ml pro Tier, z.B. unmittelbar nach der Implantation von fertilen Adultwürmern von D. viteae in Hamster übertragen werden, wirkt sich dies auf die alsbald einsetzende Mikrofilarämie partiell suppressiv aus (Haque et al. 1978).

5. Literatur

Autenrieth Ch (1971) Beeinflussung der Mikrofilarämie durch vorangehende Injektion von Embryonensuspension (Litomosoides carinii, Filariidae). Inaug. Diss. Tübingen

Cavalli-Sforza L (1969) Biometrie. Übersetzung aus dem Italienischen, 2. Auflage. Fischer Stuttgart

Eisemann W (1972) Intravenöse Injektion von Embryonen-Suspensionen und Verlauf der Mikrofilarämie nach quantitativ durchgeführter Belastungsinfektion bei Litomosoides carinii (Filariidae, Nematoda). Inaug.Diss. Tübingen

Evans R, Alexander P (1971) Transplantation 12: 227 zit. n. Boltz-Nitulescu G (1978) Makrophagen. Natw.Rdsch. 31: 319-329

Haque A, Lefévre N, Ogilvie BM, Capron A (1978) Dipetalonema viteae in hamsters: Effects of antiserum or immunization with parasite extracts on production of microfilariae. Parasitology 76: 61-75

Humphrey JH, White RG (1972) Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 2. Auflage. Thieme Stuttgart

Illgen B (1975) Erprobung von Medien zur Haltung von Litomosoides carinii (Filariidae: Nematoda) in vitro. Dipl.Arb.Biol.Tübingen

Illgen B (1982) In vitro-Versuche mit Litomosoides carinii (Nematoda: Filarioidea) II. Einfluß verschiedener Seren auf die Freisetzung von Mikrofilarien sowie Versuche zur Kopulationsbereitschaft der Würmer. Z.Parasitenkd.67: 227-236

Illgen B (in Vorbereitung) In vitro-Versuche mit Litomosoides carinii (Nematoda: Filarioidea) III. Nachweis einer spezifisch gegen Mikrofilarien gerichteten humoralen und zellulären Aktivität.

Kimmig P, Wenk P (1982) Unterdrückung der Parasitämie der Nagetierfilariose (Litomosoides carinii) durch Immunisierung mit BCG und Mikrofilarien. I. Intrakutane Application von BCG. Z. Parasitenkd. (im Druck)

Kimmig, Wenk P, Wegerhof PH, Illgen B (1978) Versuche zur Unterdrückung der Parasitämie bei der Baumwollratten-Filariose (Litomosoides carinii) mit Mikrofilarien und BCG. Zentralb. Bakt.I Abt. 267: 28

Mehta K, Sindhu RK, Subramanyam D, Nelson DS (1980) IgE-dependent adherence and cytotoxity of rat spleen and peritoneal cells to Litomosoides carinii microfilariae. Clin. Exp. Immunol. 41: 107-114

Neilson JTM, Crandall CA, Crandall RB (1981) Serum immunoglobulin and antibody levels and the passive transfer of resistance in hamsters infected with Dipetalonema viteae. Acta Tropica 38: 309-318

Nickels B (1974) Beeinflussung einer intravenösen Mikrofilarien-Injektion und einer nachfolgenden Belastungsinfektion durch vorangehende Splenektomie bei der Nagetierfilariose (Litomosoides carinii) (Nematoda: Filarioidea). Dipl.Arb.Biol.Tübingen

Sachs L (1971) Statistische Methoden. 3. Auflage. Springer Berlin-Heidelberg-New York

Wegerhof PH (1975) Verlauf der Mikrofilarämie nach Injektion von Mikrofilarien der Nagetierfilarie (Litomosoides carinii) CHANDLER 1931 (Filariidae: Nematoda) in Baumwollratten. Dipl. Arb. Biol. Tübingen

Wegerhof PH (1977) Beeinflussung des Parasit-Wirt-Verhältnisses zwischen der Nagetierfioerie (Litomosoides carinii) (Nematoda: Filarioidea) und der Baumwollratte (Sigmodon hispidus) durch Injektion von Mikrofilarien. Diss.Biol.Tübingen

Wegerhof PH, Wenk P (1979) Studies on aquired resistance of the cotton rat against microfilariae of Litomosoides carinii. I. Effects of single and repeated injection of microfilariae. Z. Parasitenkd. 60: 55-64

Weiss N, Tanner M (1979) Studies on Dipetalonema viteae (Filarioidea) 3. Antibody-dependent cell-mediated destruction of microfilariae in vivo. Parasitol. 30: 73-80

Wenk P, Illgen B, Seitz HM (1978) In vitro-Versuche mit Litomosoides carinii (Nematoda: Filarioidea). I. Haltung von adulten Weibchen und Mikrofilarien sowie Ausstoß von Mikrofilarien in verschiedenen Kulturmedien. Z. Parasitenkd. 55: 63-72

Wenk P, Wegerhof PH (1982) Studies on aquired resistance of the cotton rat against microfilariae of Litomosoides carinii. II. Injection of microfilariae during prepatency. Z. Parasitenkd. (im Druck)

Wong MM (1964) Studies on microfilaremia in dogs. II. Levels of microfilaria to immunologic responses of the host. Am. J. Trop.Med.Hyg. 13: 66-77

Versuche	Vorbehandlung d. Mf	Versuchs-Tiere	Mikrofilarämie in Mf/mm³ (aMT) Tage p. injectionem 1	3	7	10	Signifikanz[1]	mx i Mfie aMT n^+/n^T	Dauer der Mfie Tage	Signifikanz[2]
1	Immun-Serum	normale BWR 8 Tiere	2.63	1.75	0.50	0.50	2α	3.13 8/8	3.24	2α
		immun.-BWR 5 Tiere	0	0	0	0	< 0.05	0 0/5	0	< 0.01
2	Normal-Serum	normale BWR 5 Tiere	13.00	2.00	0.40	0	nicht	13.00 5/5	3.91	2α
		immun.-BWR 5 Tiere	5.20	0.80	0	0	sigf.	5.20 4/5	2.01	< 0.02
3	Tc 199	normale BWR 5 Tiere	13.40	1.60	0.60	0	nicht	12.80 5/5	4.63	nicht
		immun.-BWR 5 Tiere	9.40	1.20	0.20	0	sigf.	9.40 5/5	2.35	sigf.

Tab. 1: Verlauf der Mikrofilarämie nach Injektion von 6×10^6 in vitro Mikrofilarien i.v. in immunisierten (immun.-) bzw. normalen Baumwollratten (BWR). mx i Mfie = maximale individuelle Mikrofilarämie als arithmetisches Mittel des Totals (aMT). Die Dauer der Mikrofilarämie (Mfie) wird als harmonisches Mittel (hM) angegeben. Signifikanz: 1) bezieht sich auf die Mf-Werte während der Mikrofilarämie 2) bezieht sich auf die Dauer der Mikrofilarämie.
n^+/n^T = Anzahl Mf-positiver zur Gesamtzahl Tiere.

Versuche	Vorbehandlung d. Mf	Versuchs-Tiere	Mikrofilarämie in Mf/mm^3 (aMT) Wochen p. infectionem				Mx i Mfie (aMT)	Anzahl Tiere n^+/n^T	Signifikanz
			8	10	13	16			
1	Immunserum	normale BWR	0	0	0.5	0	0.5	1/8	nicht signifikant
		immun.-BWR	0	0.4	0.6	0.8	0.8	1/5	
2	Normalserum	normale BWR	0.2	0.2	1.6	1.0	1.6	4/5	$2\alpha < 0.05$
		immun.-BWR	0	0	0	0	0	0/5	
3	Tc 199	normale BWR	0.2	0.8	4.8	2.8	5.2	5/5	$2\alpha < 0.05$
		immun.-BWR	0	0	0	0	0	0/5	

Tab. 2: Verlauf der Parasitämie nach Belastungsinfektion mit 60 metazyklischen Larven in immunisierten (immun.-) bzw. normalen Baumwollratten (BWR), nach Vorbehandlung mit in vitro Mikrofilarien. Die maximale individuelle Mikrofilarämie (mx i Mfie) ist als arithmetisches Mittel (aMT) angegeben. n^+/n^T = Anzahl Mf-positiver zur Gesamtzahl Tiere. Die Signifikanzangabe bezieht sich auf die Mf-Werte während der Belastungsinfektion.

Versuche	Inkubation der Mf in		Versuchstiere immun BWR	Versuchstiere normale BWR	Signifikanz $2\alpha =$
1	Immunserum	Pleura	1572,0	595,3	0.01
		Lunge	92,1	6,2	0.02
		♀ aW	8,0	9,0	n.s.
		Rfr%	13,3	15,0	n.s.
		n	5	8	
2	Normalserum	Pleura	2250,0	2499,0	n.s.
		Lunge	63,9	1157,0	0.01
		♀ aW	11,6	13,2	n.s.
		Rfr%	19,3	22,0	n.s.
		n	5	5	
3	Tc 199	Pleura	2302,0	3077,0	n.s.
		Lunge	89,1	145,4	n.s.
		♀ aW	10,2	16,2	n.s.
		Rfr%	17,0	23,7	n.s.
		n	5	5	

Tab. 3: Mikrofilarien pro mm^3 Blut in der Pleuraflüssigkeit und im Lungenblut sowie Rückfindungsrate (Rfr%) in % 16 Wochen nach Belastungsinfektion von immunisierten (immun-) bzw. normalen Baumwollratten (BWR) n.s. = nicht signifkant, ♀ aW = Anzahl weiblicher Würmer.

L e b e n s l a u f

I l l g e n , Brunhilde, geboren am 14. April 1950 in Zagreb/Jugoslawien als Tochter des Ing. Werner Illgen und seiner Ehefrau Nada, geb. Susic (Philologin).
Meine ersten Lebensjahre verbrachte ich in Zagreb, erst im Frühjahr 1957 kamen wir nach Oberndorf/N. (Kreis Rottweil).

1957 Eintritt in die Evang. Volksschule Oberndorf/N.

1960 Eintritt ins Progymnasium Oberndorf/N. (Math. Naturw. Gymnasium mit Latein) nach Aufnahmeprüfung.

1966 Eintritt ins Gymnasium Horb/N. (Math. Naturw. Gymnasium mit Latein)

1969 Reifeprüfung an dieser Schule, Beginn des Studiums der Biologie (Diplom) an der Universität Tübingen.

1971 Vorprüfung zur Diplomprüfung in Biologie

1975 Diplomprüfung in Biologie mit den Fächern Zoologie, Biochemie, Hygiene (incl. medizinische Mikrobiologie) und Humangenetik (incl. Anthropologie) vor dem Fachbereich Biologie der Universität Tübingen. Beginn der Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Wenk am Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer:

Universität Tübingen:

Botanik:	Mägdefrau, Schwemmle
Biochemie:	Guglielmi, Weitzel, Weser
Humangenetik:	Haberlandt, Ritter, Schmitt
Hygiene:	Bader, Gerth
Zoologie:	Grell, Harder, Kretschmar, Möhres, Pfeiffer, Wenk